

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

**REDOXNÍ A KATALYTICKÉ VLASTNOSTI  
MODIFIKOVANÉHO PAPAINU**

**Redox and Catalytic Properties of Modified Papain**

Štěpánka Lachmanová

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Mgr. Magdaléna Hromadová Ph. D.

Praha 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Jiřího Hudečka CSc. a školitelky specialistky Mgr. Magdalény Hromadové, Ph. D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: 1. 6. 2010

.....

Štěpánka Lachmanová

## Poděkování

Děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení práce, Mgr. Magdaléně Hromadové, Ph. D. za odborné náměty, rady a připomínky a Dr. Michéle Salmain a dalším pracovníkům Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris ve Francii za syntézu komplexu TB11, jeho charakterizaci a navázání na papain. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře Elektrodové kinetiky oddělení Molekulární elektrochemie Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AV ČR, v. v. i. za pomoc při měřeních, především Mgr. Viliamu Kolivoškovi za vedení při měření metodou AFM.

Tato práce vznikla za finanční podpory GAAV (IAA400400802) a GACR (203/08/1157 a 203/09/1607).

# Obsah

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
1. Seznam použitých zkratk.....	5
2. Abstrakt.....	6
3. Abstract.....	7
4. Úvod.....	8
4.1. Úvod do problematiky.....	8
4.1.1. Papain.....	8
4.1.2. Syntetické metaloproteiny.....	9
4.1.3. Katalytické vlastnosti syntetických metaloproteinů.....	9
4.1.4. Organometalické komplexy pro přípravu syntetických metaloproteinů.....	10
4.1.5. Komplex TB11 a jeho vazba na papain.....	10
4.2. Teoretický popis použitých metod.....	12
4.2.1. Elektrochemické metody.....	12
4.2.1.1. Stacionární voltametrie: DC polarografie.....	12
4.2.1.2. Nestacionární voltametrie: Cyklická voltametrie.....	16
4.2.1.3. AC polarografie a AC voltametrie.....	16
4.2.1.4. Bioelektrochemie.....	17
4.2.2. Mikroskopie atomárních sil.....	18
5. Cíl práce.....	21
6. Experimentální část.....	22
6.1. Chemikálie a roztoky.....	22
6.2. Přístroje.....	23
6.2.1. Elektrochemická měření.....	23
6.2.2. Mikroskopie atomárních sil.....	23
6.3. Metody.....	24
6.3.1. Elektrochemické metody.....	24
6.3.2. Mikroskopie atomárních sil.....	24
7. Výsledky.....	26
7.1. Elektrochemická měření.....	26
7.2. Mikroskopie atomárních sil.....	33
8. Diskuse.....	38
8.1. Elektrochemická měření.....	38
8.2. Mikroskopie atomárních sil.....	40
9. Souhrn.....	42
10. Seznam použité literatury.....	43

## 1. Seznam použitých zkratek

### Kapitola 4.1.5

TB11 (str. 10) organometalický komplex ruthenia:



### Kapitola 4.2.1

AC (str. 16) *alternating current* – střídavý proud

CV (str. 16) *cyclic voltammetry* - cyklická voltametrie

DC (str. 12) *direct current* – stejnosměrný proud

DME (str. 14) *dropping mercury electrode* - kapající rtuťová elektroda

HMDE (str. 15) *hanging mercury drop electrode* – visící rtuťová kapková elektroda

MFE (str. 15) *film mercury electrode* - filmová rtuťová elektroda

SMDE (str. 15) *static mercury drop electrode* - statická rtuťová kapková elektroda

### Kapitola 4.2.2

AFM (str. 18) *atomic force microscopy* - mikroskopie atomárních sil

HOPG (str. 20) *highly oriented pyrolytic graphite* - vysoce orientovaný pyrolytický grafit

STM (str. 18) *scanning tunneling microscopy* - rastrovací tunelová mikroskopie

SPM (str. 18) *scanning probe microscopy* - rastrovací mikroskopie

### Kapitola 6.1

DMSO (str. 23) dimethylsulfoxid

TBAPF<sub>6</sub> (str. 23) tetrabutylamonium hexafluorofosfát

THAPF<sub>6</sub> (str. 23) tetrahexylamonium hexafluorofosfát

## 2. Abstrakt

Endopeptidasa papain může být modifikována navázáním organometalického komplexu  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)\text{Cl})\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$ , ( $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ) = 1,10-fenanthrolin (TB11) na volnou sulfhydrylovou skupinu cysteinu v aktivním centru enzymu. Tato modifikace ovlivňuje jeho katalytické vlastnosti. Za použití polarografických a voltametrických metod jsme prostudovali redoxní vlastnosti komplexu TB11 ve volné formě a po jeho navázání na papain. Modifikovaná endopeptidasa se redukuje v adsorbovaném stavu a proto byla ke studiu přenosu elektronu v modifikovaném papainu použita fázově rozlišená AC voltametrie, která poskytuje vhodnou metodologii pro studium reakcí přenosu elektronu v systémech ovlivněných adsorpcí. Při použití AC metody byl pozorován signál katalytického vylučování vodíku nejen u odpovídajícího komplexu TB11, ale i pokud byl tento komplex kovalentně navázaný na papain. Dané výsledky umožní lépe pochopit mechanismus katalýzy hydrogenačních reakcí za přítomnosti enzymu modifikovaného komplexem TB11.

Adsorpční vlastnosti papainu na různých substrátech byly studovány pomocí AFM měření, přičemž byla tvorba kompaktní monovrstvy papainu prokázána pro zlatý substrát modifikovaný vrstvou kyseliny 11-sulfanylundekan-1-ové.

### 3. Abstract

Endopeptidase papain could be modified by the organometallic complex  $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)\text{Cl})\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$ , ( $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ) = 1,10-phenanthroline (TB11), which binds to the free sulfhydryl group of cysteine in the active centre of protein. This modification influences the catalytic properties of papain. The redox properties of the TB11 complex in its free form and when it is bound to papain were studied by the polarographic and voltammetric methods. Modified endopeptidase is reduced in the adsorbed state. Therefore, a phase-sensitive AC voltammetry is used for studies of the electron transfer in the TB11 modified papain. This method gives suitable methodology for studying the electron transfer rates in the systems influenced by adsorption. Using this method the catalytic hydrogen evolution process was detected not only in the TB11, but also for TB11 covalently-attached to the papain molecule. The results help better understand the catalytic mechanism of the hydrogenation reactions in the presence of TB11 modified enzyme. Adsorption properties of papain at different substrates were studied by AFM measurement. The formation of a compact monolayer was proved for the gold substrate modified by a layer of 11-mercaptoundecanoic acid.

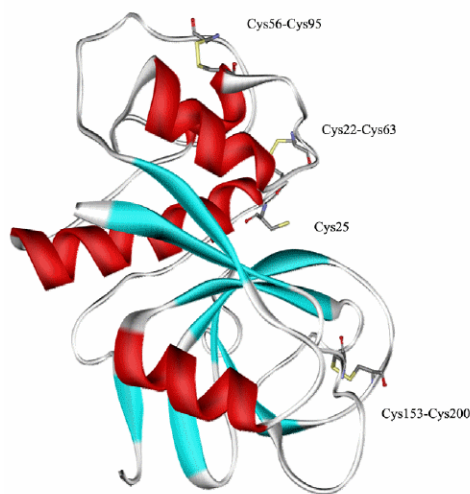
## 4. Úvod

### 4.1. Úvod do problematiky

#### 4.1.1. Papain

Peptidasy, tedy enzymy štěpící peptidovou vazbu, se dělí na exopeptidasy a endopeptidasy podle místa zásahu. Endopeptidasy jsou dále klasifikovány podle reaktivní skupiny ve svém aktivním centru na serinové, cysteinové a aspartátové, zvláštní kategorie zahrnuje metaloendopeptidasy obsahující kationt kovu. Cysteinové proteasy byly objeveny v enzymové výbavě virů, bakterií, prvoků, hub, rostlin i savců.<sup>1</sup>

Jednou z velice důkladně prostudovaných rostlinných cysteinových proteas je papain (EC 3.4.22.2, papaya proteinase I).<sup>1</sup> Dodnes používanou verzi jeho primární struktury určil Mitchel v roce 1970. Pro tento monomerní polypeptid stanovil 212 aminokyselin o celkové relativní molekulové hmotnosti 23 406.<sup>2</sup> Papain obsahuje celkem 7 sulfhydrylových skupin, pouze jedna z nich je volná, ostatní tvoří disulfidické můstky (Cys22 - Cys63, Cys56 - Cys95, Cys153 - Cys200) (Obr. 4.1). Právě volná -SH skupina cysteinu Cys25 slouží jako vazné místo substrátu v aktivním centru enzymu.<sup>1,2</sup> Chemická modifikace této sulfhydrylové skupiny způsobuje ztrátu peptidasové aktivity papainu.<sup>3</sup>



Obr. 4.1: Struktura papainu s vyznačenými polohami cysteinu<sup>13</sup>

Nejčastějším zdrojem papainu je latex získaný z nedozrálých plodů rostliny *Carica papaya*. Tyto plody navíc obsahují i další endopeptidasy, například chymopapain nebo caricain.<sup>4</sup> Význam přítomnosti papainu

v rostlině *Carica papaya* (a obecně přítomnost cysteinových proteas v některých rostlinách, např. ficinu ve fíkovníku *Ficus virgata*) nebyl poměrně dlouho znám. Latex byl všeobecně považován za jeden ze způsobů ochrany rostlin vůči škůdcům, nicméně latex získaný z většiny latex-produkujících rostlin (např. morušovníku, gumovníku, smetánky nebo fíkovníku) neobsahuje žádné očividné toxiny. Naproti tomu obsahuje



velké množství enzymů, kromě proteas např.  $\beta$ -D-glukosidasu a chitinasu. V roce 2004 bylo prokázáno, že právě cysteinové proteasy jsou toxické pro larvy hmyzu parazitujícího na listech latex-produkujících rostlin, přičemž způsobují inhibici jejich růstu. Konkrétně papain chrání rostlinu před hmyzími škůdci jako je *Samia ricini* (martináč), *Mamestra brassicae* (můra zelná) nebo *Spodoptera litura* (blýskavka).<sup>5</sup>

Papain je i v současné době využíván v potravinářství, mimo jiné na změkčení masa nebo při výrobě piva.<sup>6</sup>

Purifikace papainu z rostlinného latexu se většinou provádí kombinací precipitačních a chromatografických postupů. Získ papainu o vysoké čistotě (použitím tradičních metod bývá výsledný produkt často znečištěn jinými papayovými endopeptidasami) poskytuje extrakce využívající vodný dvoufázový systém (polymer-sůl-voda nebo polymer-polymer-voda).<sup>4</sup>

#### **4.1.2. Syntetické metaloproteiny**

Podle odhadů obsahuje třetina všech enzymů iont kovu, který svou přítomností umožňuje biokatalýzu mnoha složitých biochemických dějů.<sup>7</sup>

Mnoho enzymů vykazuje schopnost katalyzovat hned několik chemických reakcí,<sup>8</sup> další katalytické aktivity lze získat drobnými úpravami aktivního centra enzymu.<sup>9</sup> Další možnosti nabízí navázání kovového kationtu, většinou umístěného do koordinační kostry.<sup>9</sup>

Syntetické metaloproteiny se obvykle dělí podle způsobu navázání organometalického komplexu na protein, podle typu reakce, kterou může vzniklý metaloenzym katalyzovat, a podle biomolekulárního hostitele.<sup>9</sup>

Jednou z používaných metod propojení enzymu s koordinační sloučeninou je kovalentní vazba komplexu na nukleofilní skupiny aminokyselin jako je sulfhydrylová skupinu cysteinu a  $\epsilon$ -aminoskupina lysinu.<sup>9,10</sup>

#### **4.1.3. Katalytické vlastnosti syntetických metaloproteinů**

Chemických reakcí, které mohou být katalyzovány některými ze syntetických metaloproteinů, je známo poměrně velké množství. Mimo jiné mezi ně patří redoxní reakce (hydrogenace, redukce ketonů, oxidace alkoholů, redukce iminů, epoxidace, sulfoxidace, peroxidace...), hydrolytické štěpení, tvorba nových C-C vazeb (hydroformylace, Dielsova-Alderova cykloadice), transaminace nebo izomerace

allylických alkoholů. Mnoho z těchto reakcí hraje důležitou roli v organické chemii; za přítomnosti syntetického metaloproteinu umožňuje jejich průběh za mírnějších reakčních podmínek než při použití tradičních technologií.<sup>3,9</sup>

Mnoho vědeckých prací se zaměřuje na studium hydrogenace katalyzované syntetickými metaloproteiny z důvodu možnosti jejich využití pro syntézu enantioselektivních molekul. Zájem o rozšíření možností výroby biologicky aktivních látek, které musí být z enantiomerního hlediska čisté, stále roste. Jednou z nejnadějnějších syntetických metod je metaloproteinová enantioselektivní hydrogenace ketonů ve vodném a nevodném prostředí.<sup>11</sup>

Kromě katalytické funkce je nezanedbatelná možnost využití syntetických metaloproteinů pro stanovení struktury enzymu v tomto systému. Fyzikální a spektroskopické vlastnosti přechodného kovu v komplexu mohou být využity v rozličných oblastech biologie, medicíny, analytické biochemie i radiofarmacie. Jedná se především o vysokou elektronovou hustotu ve valenční vrstvě přechodného kovu poskytující možnost určení struktury za použití rentgenového záření. Mnohé kovy umožňují přípravu radioizotopově značených proteinů nebo v kombinaci s karbonylovou vazbou poskytují infračervená spektra.<sup>12</sup>

#### **4.1.4. Organometalické komplexy pro přípravu syntetických metaloproteinů**

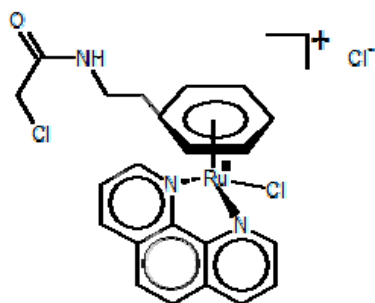
Do současnosti bylo nasyntetizováno mnoho koordinačních sloučenin, které by mohly být použity pro návrh nových metaloproteinů umožňujících přípravu asymetrických molekul v dostatečném výtěžku, ale prozatím nebyly příliš úspěšné.<sup>3,9,13,14</sup>

Mezi základní vlastnosti nově připravených organometalických komplexů určených pro tento účel je jejich stabilita v aerobním vodném prostředí. Dále by měly být odolné vůči hydrolýze. Vazba na protein musí probíhat za mírných reakčních podmínek, musí být specifická a množství navázaného komplexu stejně jako samotná úspěšnost navázání na protein musí být snadno detekovatelné dostupnými metodami.<sup>15</sup>

#### **4.1.5. Komplex TB11 a jeho vazba na papain**

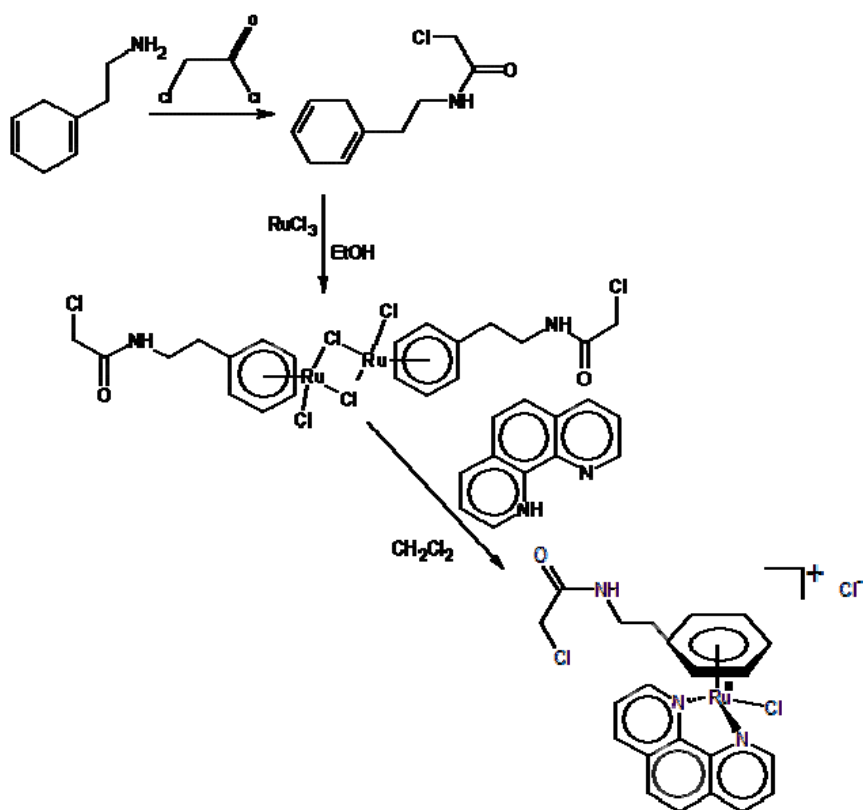
Organometalický komplex TB11 (*Obr. 4.2*, str. 11), který byl nasyntetizován sledem organických reakcí (*Obr. 4.3*, str. 11), obsahuje kromě kationtu dvojmocného

ruthenia a 1,10-fenantrolinu i chloroacetamidovou skupinu, která patří mezi skupiny charakteristicky reagující s volnou sulfhydrylovou skupinou cysteinu přítomného v proteinu (papainu).



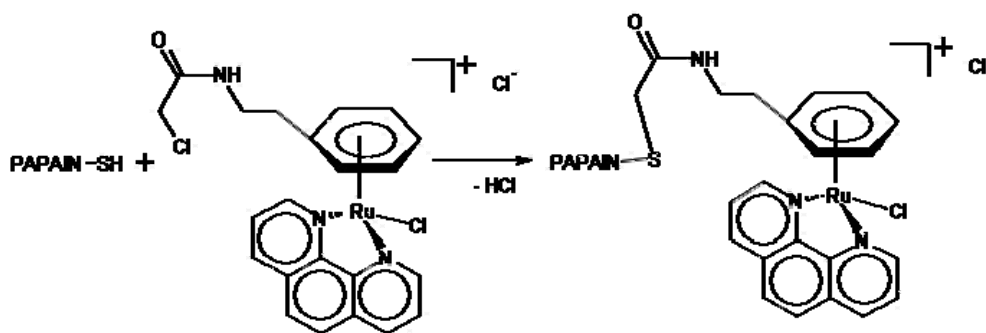
Obr. 4.2: Struktura komplexu TB11<sup>3</sup>

Okrově žlutá sloučenina TB11 se nerozkládá na vzduchu a má schopnost katalyzovat přenos protonu při hydrogenaci ketonů a iminů nebo Dielsovu-Alderovu reakci. TB11 je velice dobře rozpustná v methanolu, DMSO i ve vodě. Ve vodném prostředí dochází k rovnovážné výměně chloridového ligandu za molekulu vody.<sup>3</sup>



Obr. 4.3: Schéma syntézy TB11<sup>3</sup>

Jak bylo potvrzeno ESI-MS analýzou, kovalentní vazba komplexu TB11 na papain probíhá selektivně podle schématu znázorněného na *Obr. 4.4*. Chemická modifikace sulfhydrylové skupiny v aktivním centru způsobuje ztrátu peptidasové aktivity enzymu. Kinetika inaktivace byla nepřímo sledována poklesem proteasové aktivity papainu.<sup>3</sup>



*Obr. 4.4:* Schéma navázání komplexu TB11 na volnou sulfhydrylovou skupinu cysteinu v aktivním centru papainu<sup>3</sup>

## 4.2. Teoretický popis použitých metod

### 4.2.1. Elektrochemické metody

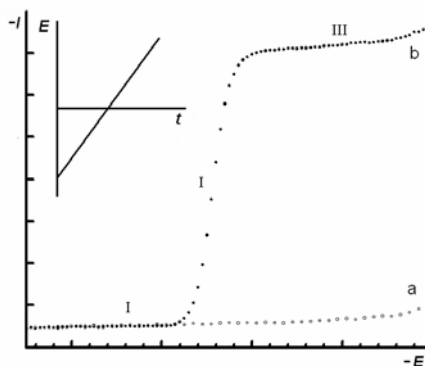
V bakalářské práci jsem používala voltametrické metody (pokud je měření prováděno na pevných elektrodách, jedná se o voltametrii, pokud se měří na kapající rtuťové elektrodě, označuje se metoda jako polarografie). Podle definice se při těchto metodách sleduje závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou, která je ponořena v analyzovaném roztoku, na potenciálu, jenž je na tuto elektrodu vkládán z vnějšího zdroje. Výstupem této závislosti je voltametrická křivka.<sup>16a,17</sup>

#### 4.2.1.1. Stacionární voltametrie: DC polarografie

Při měření metodou stacionární DC (*direct current*) voltametrie se na pracovní elektrodu vkládá stejnosměrné napětí, které se v závislosti na čase lineárně mění. Ve srovnání s rychlostí ustavování rovnováhy v okolí elektrody je tato změna napětí dostatečně malá, proto lze metodu považovat za stacionární při konstantním potenciálu.<sup>16a</sup>

Pokud není v okolí elektrody přítomna elektroaktivní látka, která by se mohla oxidovat nebo redukovat, v elektrochemické cele protéká proud, jemuž se říká nabíjecí. Závislost nabíjecího proudu na vkládaném napětí se nazývá základní linie (angl. *baseline*). Pokud je v elektrochemické cele přítomna elektroaktivní látka, měříme proud odpovídající redukci (katodický) nebo oxidaci (anodický) této látky. Jeho hodnota je podmíněna nízkou rychlostí některého z dílčích dějů. Mezi ně můžeme zařadit rychlost přenosu náboje (tedy rychlost oxidace nebo redukce), transportní děje (transport elektroaktivní látky k elektrodě a transport produktu elektrodové reakce od elektrody), adsorpce (elektroaktivní látka nebo produkt elektrodové reakce se adsorbuje na povrch elektrody) nebo chemická reakce probíhající v roztoku, která ovlivňuje koncentraci elektroaktivní látky.<sup>16a,17,18</sup>

Voltametrická křivka je grafickým výstupem voltametrických měření, znázorňuje závislost proudu na vnějším napětí. Tvar křivky nezávisí na volbě nepolarizovatelné (referentní) elektrody (křivka bude pouze posunuta po potenciálové ose). Tvar křivky je závislý na polarizaci pracovní elektrody, její polarizace je funkcí složení roztoku. V DC polarografii se charakteristická voltametrická křivka nazývá polarografická a má několik částí. (*Obr. 4.5*) Při nízkém potenciálu (oblast I na *Obr. 4.5*) ještě nedochází k elektrodové reakci, proto hodnota měřeného proudu téměř nezávisí na vkládaném napětí. Pokud je sledovaný elektrochemický děj redukcí, označuje se proud procházející systémem jako katodický a byla mu definicí dána záporná hodnota. Pracovní elektroda je polarizovaná, systémem prochází pouze nabíjecí proud. Při určité hodnotě napětí začne probíhat elektrodová přeměna elektroaktivní látky (dochází k depolarizaci pracovní elektrody, proto se elektroaktivní látky také nazývají depolarizátory), proud rychle stoupá (oblast II na *Obr. 4.5*). Po vyčerpání elektroaktivní látky z okolí elektrody dochází ke koncentrační polarizaci pracovní elektrody, proud je opět konstantní (oblast III na *Obr. 4.5*), označuje se jako limitní difusní proud.<sup>16a,17,19,20</sup>



Obr. 4.5: Polarografická křivka

Křivka *a*: základní linie (v roztoku není přítomna elektroaktivní látka), křivka *b*: po přidavku depolarizátoru t. j. elektroaktivní látky do roztoku; oblast I: neprobíhá elektrodová reakce, systémem prochází pouze nabíjecí proud, oblast II: dochází k elektrodové reakci, proud s malou změnou potenciálu rychle stoupá, oblast III: vlivem spotřeby elektroaktivní látky v okolí elektrody dochází ke koncentrační polarizaci pracovní elektrody a systémem prochází limitní difusní proud. Ve výřezu<sup>21</sup> je graf znázorňující lineární závislost vkládaného napětí na čase.

Hodnota limitního difusního proudu je závislá na koncentraci depolarizátoru v roztoku. Potenciál odpovídající polovině hodnoty limitního difusního proudu, tzv. půlvlnový potenciál, je charakteristický pro danou elektroaktivní látku. Jedním měřením je tedy možné získat zároveň kvalitativní i kvantitativní údaje o elektroaktivní látce přítomné v roztoku. Pokud se od sebe jednotlivé elektroaktivní látky (nebo různé elektroaktivní formy jedné látky) liší půlvlnovým potenciálem, je možné stanovit je najednou.<sup>16a,17,19,20</sup>

Rtuťová elektroda má hned několik zásadních výhod oproti pevným elektrodám. Má malý povrch, proto se na ní při probíhající elektrodové reakci změní jen malé množství elektroaktivní látky, koncentrace analytu v roztoku se tedy téměř nesníží a proto je možné měření několikrát opakovat bez zásadní změny výsledku. Malý povrch rtuťové kapky na konci kapiláry umožňuje provádění měření i ve velmi malých objemech analyzovaného roztoku. Povrch elektrody se odkapáváním rtuti obnovuje, proto není ovlivněn předchozími elektrodovými reakcemi. Navíc se na rtuti ustanovuje velké přepětí vodíku (vyučování vodíku probíhá až při vysokých potenciálech), tudíž je možné provádět měření i v kyselých roztocích, aniž by se vylučoval vodík a tím rušil měření (např. při stanovování alkalických kovů v neutrálním prostředí lze pracovat při vysokých potenciálech, při kterých jsou právě alkalické kovy detekovatelné, nicméně na pevných elektrodách je jejich voltametrická vlna překryta vlnou vylučování vodíku z roztoku). Rtuťová elektroda má velké

potenciálové okno, podle podmínek lze měřit od +0,4 V (při vyšších potenciálech se rtuť anodicky rozpouští) až do -2,6 V ve vodných roztocích (poté dochází k elektrochemickému rozkladu vody), v nevodných je možné jít ještě do zápornějších potenciálů (až -3,0 V podle použitého rozpouštědla) proti normální kalomelové elektrodě.<sup>16a,17,20</sup>

Klasickou kapající rtuťovou elektrodu (*dropping mercury electrode*, DME) tvoří skleněná kapilára (vnitřní průměr 0,05 - 0,08 mm), která je propojena s rezervoárem rtuti. Rtuť z kapiláry odkapává v pravidelných časových intervalech (většinou okolo 3 vteřin) závislých podle Ilkovičovy rovnice (rovnice 4-2) na výšce rtuťového sloupce, protože ta ovlivňuje hmotnostní průtok rtuti kapilárou. Pro průtokovou rychlost  $m$  platí podle Hagenova-Poiseuilleova zákona závislost:

$$m = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \rho \cdot P}{8 \cdot \eta \cdot l}, \quad (4-1)$$

kde  $m$  značí průtokovou rychlost,  $\pi$  je Ludolfovo číslo,  $r$  vnitřní průměr kapiláry,  $\rho$  hustota rtuti,  $P$  je efektní hydrostatický tlak působící na rtuť u ústí kapiláry,  $\eta$  značí koeficient viskozity rtuti a  $l$  je délka kapiláry.<sup>19,20</sup>

Ilkovičova rovnice pro limitní difusní proud má tvar:

$$I_d = k \cdot z \cdot F \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot m^{\frac{2}{3}} \cdot t^{\frac{1}{6}} \cdot c, \quad (4-2)$$

kde  $I_d$  značí limitní difusní proud,  $k$  je konstanta,  $z$  je počet elektronů potřebných k redukci jedné částice elektroaktivní látky,  $F$  je Faradayova konstanta,  $D$  difusní koeficient dané látky,  $m$  průtoková rychlost rtuti kapilárou,  $t$  je doba trvání jedné kapky,  $c$  je koncentrace elektroaktivní látky v roztoku.<sup>19,20</sup>

V současné elektrochemii se častěji než DME používá statická rtuťová kapková elektroda (*static mercury drop electrode*, SMDE), kdy je kapka u ústí kapiláry pravidelně obnovována v určených časových intervalech elektronicky řízeným klepátkem. Velikost kapky je možné upravit nastavením doby otevření uzávěru mezi rezervoárem a kapilárou. Při vypnutí mechanicky řízeného klepátka je možné provádět měření na visící rtuťové kapkové elektrodě (*hanging mercury drop electrode*, HMDE), kdy se kapka u ústí kapiláry neobnovuje.<sup>16a</sup>

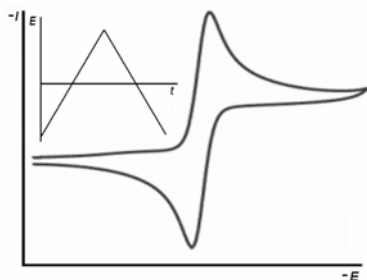
Další variantou je rtuťová filmová elektroda (*mercury film electrode*, MFE), která se používá v rozpouštěcí elektrochemické analýze. MFE tvoří mikroskopické kapičky rtuti na povrchu tuhé elektrody. Nevýhodou tohoto uspořádání je obtížnější

obnovování povrchu rtuti, ale výhodou je možnost citlivějšího stanovení analytu díky minimálnímu objemu rtuti.<sup>16a</sup>

#### 4.2.1.2. Nestacionární voltametrie: Cyklická voltametrie

Měřená veličina je u nestacionárních elektrochemických metod závislá na čase. Při nestacionárních voltametrických měřeních se kontroluje potenciál a sleduje se závislost proudu na čase. U nestacionárních metod dochází v závislosti na čase k poklesu koncentračního gradientu, na kterém je závislá hodnota proudu.<sup>16b</sup>

Při cyklické voltametii (*cyclic voltammetry*, CV) se na stacionární elektrodu (HMDE nebo pevné elektrody) vkládá v nemíchaném roztoku potenciál trojúhelníkového průběhu (Obr. 4.6). Rychlost změny potenciálu na čase  $v = dE/dt$  se nazývá rychlost polarizace a je jedním s důležitých parametrů cyklické voltametrie.<sup>16b</sup>

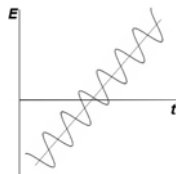


Obr. 4.6: Cyklická voltametrie

Závislost proudu na vkládaném napětí. Ve výřezu<sup>21</sup> je znázorněna změna napětí na čase.

#### 4.2.1.3. AC polarografie a AC voltametrie

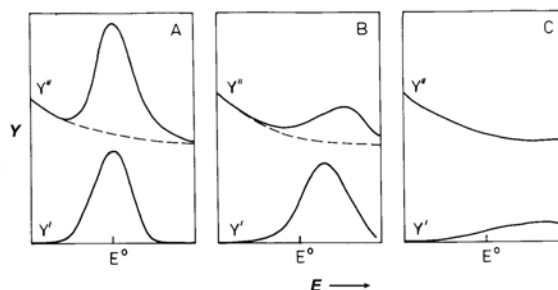
Podle definice se při AC voltametii (*alternating current*, AC) na elektrodu vkládá potenciál, který se mění lineárně s časem a který je modulovaný střídavým napětím sinusového průběhu o malé amplitudě a frekvenci do několika tisíc Hertzů. Pokud je měření prováděno na kapající rtuťové elektrodě (DME nebo SMDE), jedná se o AC polarografii.



Obr. 4.7: Průběh potenciálu v závislosti na čase při měření AC voltametrie



Měří se závislost střídavého proudu procházejícího elektrodou na jejím potenciálu.<sup>16b</sup> Signálem získaným z AC polarografického měření je reálná a imaginární složka admitance  $Y$ .



Obr. 4.8: Fázově citlivá AC voltametrie<sup>22</sup>

Obrázek **A** znázorňuje výslednou křivku při probíhající reverzibilní ději, obrázek **B** zachycuje situaci při průběhu kvazi-reverzibilního děje a obrázek **C** při probíhající ireverzibilní ději. Přerušované křivky ukazují průběh základní linie.

#### 4.2.1.4. Bioelektrochemie

Bioelektrochemie využívá metody klasické elektrochemie pro studium jak biomolekul, tak vyšších biologických struktur, jako jsou biologické membrány nebo i buňky. Většina biomakromolekul obsahuje molekuly, které patří mezi dobré elektronové donory nebo akceptory, proto mohou podstoupit elektrochemickou oxidaci nebo redukci.<sup>23</sup>

Voltametrické a polarografické studie proteinů jsou ovlivněny tím, že bílkoviny přítomné v měřeném roztoku katalyzují snížení přepětí vodíku na rtuťových elektrodách. Tento jev vyvolává přítomnost signálu ve voltamogramu pro vylučování vodíku při nižších potenciálech, než by tomu bylo při měření za stejných podmínek bez přítomnosti proteinu v roztoku.<sup>23</sup>

Proteiny mají výrazný sklon k adsorpci na kovové povrchy, tedy i na povrchy elektrod. Proteiny, které obsahují přístupné disulfidické můstky, se na povrch rtuťových elektrod adsorbují ještě silněji vlivem vzájemné interakce mezi kovem a atomy síry. Proteiny obsahující sulfhydrylové skupiny nebo disulfidické můstky také poskytují tzv. Brdičkovu katalytickou reakci, kdy v amoniakálním pufru za přítomnosti kationtů kobaltu nebo niklu vykazují charakteristický polarografický signál, jehož intenzita je závislá na dostupnosti jednotlivých -SH nebo -S-S- skupin.<sup>23</sup>

#### 4.2.2. **Mikroskopie atomárních sil**

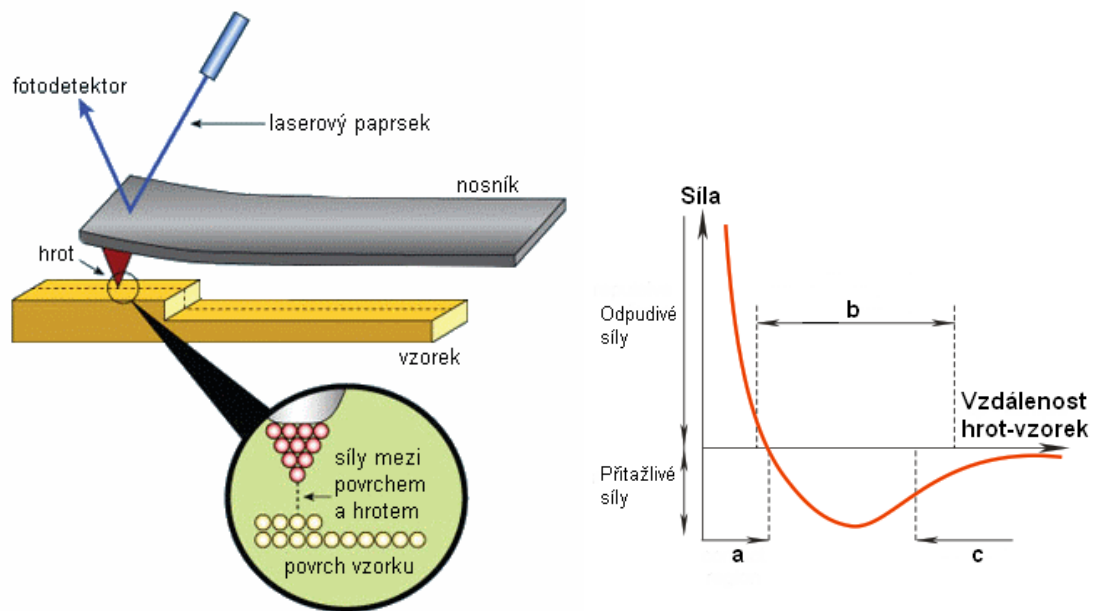
Mikroskopie atomárních sil (*atomic force microscopy*, AFM) patří spolu se svým předchůdcem rastrovací tunelovou mikroskopií (*scanning tunneling microscopy*, STM) mezi metody rastrovací mikroskopie (*scanning probe microscopy*, SPM). Tyto techniky nevyužívají interakci záření (elektrony, světlo...) se vzorkem, ale rastrovací sondu (hrot), jejíž vzdálenost od povrchu je řízena zpětnou vazbou. Rozlišovací schopnosti těchto technik proto nejsou omezené vlnovou délkou záření, ale dosaženým průměrem sondy a její vzdáleností od povrchu objektu.<sup>24</sup> Za konstrukci STM byla autorům v roce 1986 udělena Nobelova cena za fyziku.<sup>25</sup>

Přestože metoda STM slavila obrovský úspěch, má zásadní nedostatek: schopnost zobrazovat pouze dobře vodivé povrchy. Není tedy použitelná pro zobrazování biomolekul. Problém sice lze odstranit pokrytím povrchu tenkou kovovou vrstvou, ale tím se ztrácí schopnost mikroskopu zobrazit atomární detaily povrchu. Technika AFM, patentovaná Binnigem v USA v roce 1988<sup>26</sup>, je založena na odlišném principu, proto je touto metodou možné zobrazit i nevodivé povrchy. Další výhodou AFM je možnost měření nejen ve vakuu, ale i na vzduchu nebo v kapalině.<sup>24,25</sup> To umožňuje využití AFM pro zobrazování proteinů, nukleových kyselin, biomembrán nebo dokonce povrchu živých buněk v jejich přirozeném prostředí. V biochemii může být AFM využíváno na analýzu elasticity polysacharidů, sledování metabolismu nukleových kyselin, pozorování funkcí molekulárních motorů nebo vazby mezi receptorem a ligandem. Zásadní výhodou metody je její schopnost zobrazovat tyto děje v reálném čase, což většina obdobně využívaných metod neumožňuje.<sup>27,28</sup>

Metoda AFM je založena na měření síly působící mezi hrotem a vzorkem (jedná se například o elektrostatické, magnetické nebo van der Waalsovy síly).<sup>25,28</sup> Ostrý hrot je umístěn na konci pružného nosníku (raménka, angl. *cantilever*), který má velice malou tuhost (v našem případě okolo 1 N/m, hodnota se může lišit podle druhu nosníku), tedy menší než je tuhost vazeb mezi atomy. Tím je dosaženo možnosti registrovat jak odpudivé, tak přitažlivé atomární síly. Na druhou stranu je nutné zajistit vysokou tuhost nosníku ve směrech rovnoběžných s povrchem. Třecí síly při pohybu sondy by jinak způsobily nezanedbatelné výkyvy nosníku do stran a tím velice zkreslily výsledný obraz. Rychlost snímání je pokud možno maximální, aby byl sběr dat co nejrychlejší. Čím je měření kratší, tím méně je výsledek ovlivněn jinými faktory

(například tepelné změny). Nosník bývá vyroben z Si, SiO<sub>2</sub> nebo Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, dříve se testovaly nosníky vyrobené z tenkých kovových folií nebo drátků (Au, W), případně z uhlíku nebo křemene.<sup>24</sup>

Schopnost sledovat pozici hrotu (respektive nosníku) v závislosti na povrchu vzorku v atomárním rozlišení vynesla metodu AFM na významné místo mezi technikami zobrazení povrchu. Existuje hned několik technik měření malých výchylek nosníku s hrotem. Jednou z nejjednodušších metod je měření výchylky laserového paprsku odraženého od zadní stěny nosníku v místě hrotu. Výchylka paprsku je měřena polohově citlivým fotodetektozem (*Obr. 4.9* vlevo). Tato metoda detekčního systému je velice stabilní a spolehlivá, nicméně velikost nosníku je omezena vlnovou délkou použitého laseru.<sup>24</sup>



*Obr. 4.9:* Princip AFM s laserovou detekcí polohy hrotu<sup>29</sup> a diagram závislosti působící síly mezi hrotem a vzorkem na jejich vzájemné vzdálenosti<sup>28</sup>

Oblast **a** je využívána při měření v kontaktním režimu, oblast **b** se používá na měření v přerušovaném kontaktním režimu a oblast **c** v bezkontaktním režimu.

Měření může probíhat v několika režimech, které se obvykle dělí na kontaktní, přerušovaný kontaktní a bezkontaktní (*Obr. 4.9* vpravo). Každý z těchto režimů má své výhody i nevýhody.

V průběhu měření může hrot na nosníku oscilovat. Pokud je hrot v přímém kontaktu s povrchem vzorku, jedná se o měření v tzv. kontaktním režimu (*contact mode*). Při měření v kontaktních režimech hrot neosciluje. Kontakt mezi hrotem a

povrchem vzorku je dosaženo udržováním konstantní výšky pevné části nosníku a následným detekovatelným ohýbáním nosníku podle sil působících na sondu na jeho volném konci. Měření v tomto režimu je velice rychlé, ale hrozí zde nebezpečí poškození měkkých vzorků (např. biomolekul nebo polymerů) hrotem a také možnost odsouvání nepevně adsorbovaných molekul na podložním substrátu. Technika se používá pouze na poměrně hladké vzorky, větší bariéry by mohly poškodit hrot. Druhou možností je udržování konstantní síly působící na hrot nastavené tak, aby nosník nebyl prohnutý. Detekuje se změna výšky upevněného konce nosníku. Výhodou tohoto měření je možnost detekovat kromě topografie i některé další vlastnosti povrchu (např. třecí síly). Čas nutný k měření je dán rychlostí odezvy systému zpětné vazby. Stejně jako v předchozím případě hrozí poškrábání měkkých vzorků.<sup>28</sup>

Při měření v přerušovaném kontaktním režimu (*intermittent-contact mode* nebo *tapping mode*) nosník s hrotem osciluje a s povrchem se tak vždy setkává pouze na okamžik a zaznamená tak síly mezi vzorkem a povrchem. Oproti kontaktním režimům je výhodou měření v tomto režimu nižší nebezpečí poškození měkkých vzorků hrotem.<sup>28</sup>

Během měření v bezkontaktním režimu hrot osciluje nad povrchem vzorku. Zobrazení povrchu vzorku je možné vlivem silových interakcí hrotu se vzorkem, které modulují amplitudu kmitajícího nosníku, nosník se jejich vlivem oddálí nebo přiblíží k povrchu vzorku pro zachování konstantní amplitudy kmitu. Bezkontaktní režim je vhodný zejména pro biologické vzorky, které by mohly být poškozeny kontaktem s hrotem.<sup>28</sup>

Pokud jsou molekuly naadsorbované na povrch substrátu pouze lehce, mohou být odsunuty použitím některého z kontaktních režimů. Této metody se používá pro studium charakteru adsorbovaným vrstev.

Jako substráty pro uchycení vzorků se používají destičky vyrobené např. ze slídy, z monokrystalického zlata (označuje se jako Au(111)) nebo ze speciálního grafitu (*highly oriented pyrolytic graphite*, HOPG). Destičky mohou být pokryté vrstvou molekul, které interagují s povrchem podložky definovaným způsobem.

## 5. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je studium přenosu elektronů ve volném organometalickém komplexu TB11 a v molekule papainu jím kovalentně modifikované. Práce se také zabývá studiem adsorpčních vlastností papainu na vodivých substrátech různé hydrofobicity. Dané výsledky umožní lépe pochopit mechanismus katalýzy hydrogenačních reakcí za přítomnosti enzymu modifikovaného komplexem TB11.

## 6. Experimentální část

### 6.1. Chemikálie a roztoky

**Papain:** základní roztok o koncentraci  $c = 100 \text{ } \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 2,34 mg papainu (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; z latexu rostliny *Carica papaya*, 2× rekrystalizovaný, specifická aktivita 23 jednotek na mg,  $M_r = 23406$ ) v 1,11 ml deionizované vody. Základní roztok o koncentraci 100 ppm byl připraven rozpuštěním 0,35 mg papainu v 3,5 ml deionizované vody.

**TB11:** komplex byl nasyntetizován v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie).<sup>3</sup> Základní roztok o koncentraci  $c = 0,175 \text{ mmol/l}$  byl připraven rozpuštěním 0,48 mg TB11 ( $M_r = 549,84$ ) v 5,0 ml 0,1M KCl v deionizované vodě.

**Komplex papain-TB11:** navázání proběhlo v laboratoři Dr. M. Salmain (Laboratoire de chimie et biochimie des complexes moléculaires, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Francie).<sup>3</sup> Základní roztok o koncentraci  $c = 11 \text{ } \mu\text{mol/l}$  byl připraven rozpuštěním 0,29 g papain-TB11 ( $M_r = 23919$ ) v 1,1 ml 0,15M NaCl v deionizované vodě.

**1,10-fenanthrolin:** roztoky 1,10-fenanthrolinu (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA;  $M_r = 180,21$ ; čistota  $\geq 99 \text{ } \%$ ) jsem připravila rozpuštěním příslušného množství 1,10-fenanthrolinu v 0,1M roztoku THAPF<sub>6</sub> v DMSO.

**11-sulfanylundekan-1-ová kyselina** (merkaptoundekan-11-ová kyselina podle starého názvosloví): základní roztok o koncentraci 0,870 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,19 mg 11-sulfanylundekan-1-ové kyseliny (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 95 %,  $M_r = 218,36$ ) v 1 ml ethanolu.

**11-sulfanylundekan-1-ol** (11-merkaptoundekan-1-ol podle starého názvosloví): základní roztok o koncentraci 0,979 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,30 mg (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 97 %,  $M_r = 204,38$ ) v 1,5 ml ethanolu.

**Dodekan-1-thiol:** základní roztok o koncentraci 0,682 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,38 mg dodekan-1-thiolu (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA; čistota 98 %,  $M_r = 202,4$ ) v 10,0 ml ethanolu.

**Rozpouštědla:** **DMSO** (dimethylsulfoxid) byl dodán firmou Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, čistota p.a., byl uchováván pod inertní atmosférou argonu. **Ethanol** byl dodán firmou Lach-Ner, Neratovice, o čistotě p.a., **deionizovaná voda** byla připravena deionizací destilované vody na přístroji Milli-Q (Millipore, USA) s výstupním specifickým odporem vody při 25°C rovným 18,2 MΩ cm.

**Základní elektrolyty:** **THAPF<sub>6</sub>** ( $M_r = 499,65$ ) byl dodán firmou Fluka o čistotě minimálně 97 %. **TBAPF<sub>6</sub>** ( $M_r = 387,43$ ) byl od firmy Fluka o čistotě minimálně 99 %. Vždy před navážením byl elektrolyt vysušen při teplotě 60 - 80 °C. **Chlorid draselný** byl dodán firmou Lachema, Brno, o čistotě minimálně 99 %. 0,1M zásobní roztok KCl byl připraven rozpuštěním 0,373 g ( $M_r = 74,55$ ) v 50 ml deionizované vody.

## 6.2. Přístroje

### 6.2.1. Elektrochemická měření

Pro elektrochemická měření CV a DC polarografie byl použit potenciostat s rychlou odezvou, který byl zkonstruován na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, v.v.i. Spojení s počítačem bylo zajištěno pomocí IEEE-rozhraní (PC–Lab, AdvanTech Model PCL–848) a digitalizace měřených výstupů byla provedena pomocí PCL-818 karty o 12 bitové přesnosti (AdvanTech Co., USA).

AC polarografie byla měřena na potenciostatu Autolab PGSTAT30 (Ecochemie, Nizozemí). Část měření byla provedena pomocí potenciostatu domácí konstrukce v kombinaci s dvoufázovým lock-in zesilovačem (model SR830 DSP, Stanford Research Systems, USA).

Pracovní stacionární rtuťová kapková elektroda SMDE (Laboratorní přístroje, Praha) byla použita i jako visící kapková elektroda HMDE. Velikost kapky byla dána otevřením ventilu na dobu 80 ms. Plocha rtuťové kapkové elektrody je 0,0097 cm<sup>2</sup>.

### 6.2.2. Mikroskopie atomárních sil

Měření byla provedena na přístroji Agilent Technologies 5500 SPM s použitím nosníků typu II MACLevers<sup>TM</sup> (Agilent Technologies, USA), které měly rezonanční frekvenci v rozmezí 45-115 kHz a tuhost v rozpětí 0,5-9,5 N/m.

## **6.3. Metody**

### **6.3.1. Elektrochemické metody**

Veškerá použitá elektrochemická měření jsme prováděli v elektrochemické cele v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektroda byla DME, SMDE a HMDE. Pomocnou elektrodu tvořila platinová síťka. Referentní argentchloridová elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M LiCl}$  byla od měřeného roztoku oddělena solným můstkem. Kyslík v roztoku jsme vždy odstranili argonem a po celou dobu měření argon proudil nad roztokem. Vždy jsme nejprve změřili základní linii, poté jsme do roztoku přidali analyt a znovu odstranili přítomný kyslík.

Pro elektrochemická měření byly použity metody DC a AC polarografie, cyklické a AC voltametrie. Teoretický popis uvedených metod je v části 4.2.

Získaná elektrochemická data v digitální formě byla zpracována v programu Origin 8.0.

### **6.3.2. Mikroskopie atomárních sil**

Pro AFM měření jsme použili několik druhů substrátů, jmenovitě HOPG a povrchově modifikované monokrystalické zlato Au(111).

Svrchní vrstva na destičce HOPG jsme odstranili lepicí páskou a poté jsme destička očistili roztokem směsi koncentrované kyseliny sírové a 30% roztoku peroxidu vodíku smísené v poměru 3:1 (tzv. Piranha roztok).

Zlaté destičky použité jako substrát pro papain byly deponovány 18 hodin při teplotě 60 °C pod inertní atmosférou argonu v 1,0 ml roztoku dodekan-1-thiolu, 11-sulfanylundekan-1-olu nebo 11-sulfanylundekan-1-ové kyseliny v ethanolu.

Destičky s modifikovaným povrchem jsme poté opláchli ethanolem a deionizovanou vodou. Všechny následně prošly deponací v roztocích papainu (koncentrace 100 ppm) po dobu jedné hodiny za laboratorní teploty a následně jsme je opláchli deionizovanou vodou.

Vzorky byly měřeny na přístroji Agilent Technologies 5500 SPM. Vhodná místa jsme nejprve zobrazili metodou ACAFM (přerušované kontaktní režim), poté jsme odstranili část proteinové vrstvy použitím kontaktního režimu (metoda konstantní síly) a následně jsme celou oblast opět zobrazili metodou ACAFM.



Data získaná metodou AFM byla zpracována v programu Gwyddion 2.19 (ořezání okrajů, odstranění šumu, výpočet procenta pokrytí povrchu substrátu papainem). Tloušťka a charakter papainové vrstvy byla vypočtena za použití grafů zobrazujících příčný řez proteinovou vrstvou.

Povrchy byly snímány hrotem pohybujícím se ve dvou směrech (tzv. trace a retrace), výsledné obrázky vznikly kombinací obou zobrazení dané oblasti. Tím se vylepšilo rozlišení zobrazení v oblastech těsně za výraznými bariérami, které způsobují dočasnou necitlivost hrotu vůči oblastem stíněným bariérou.

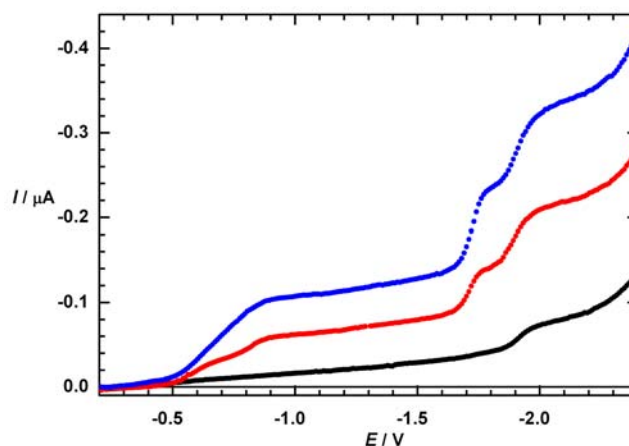
## 7. Výsledky

### 7.1. Elektrochemická měření

Elektrochemické chování TB11 doposud nebylo zkoumáno. Provedli jsme řadu DC polarografických a voltametrických měření organometalického komplexu TB11 v závislosti na typu organického rozpouštědla a na koncentraci komplexu v roztoku. Elektrochemická měření jsme prováděli v deionizované vodě, acetonitrilu a v DMSO. Jako základní elektrolyt pro vodné roztoky jsme použili KCl, pro nevodné roztoky TBAPF<sub>6</sub> nebo THAPF<sub>6</sub>. Z důvodu potlačení adsorpčních vlivů na celkový přenos elektronu se jako nejvhodnější ukázalo použití DMSO. U papainu by ale docházelo k denaturaci, proto byly v DMSO měřeny pouze 1,10-fenanthrolin a TB11. Pro komplex TB11 byla pro srovnání změřena DC polarografie i cyklická voltametrie ve vodném i nevodném roztoku.

Možnost oxidace organometalického komplexu TB11 jsme studovali pomocí cyklické voltametrie na zlaté elektrodě. Pro tuto látku nebyla zaznamenána žádná významná elektrochemická odezva, proto byla další měření prováděna v redukční potenciálové oblasti.

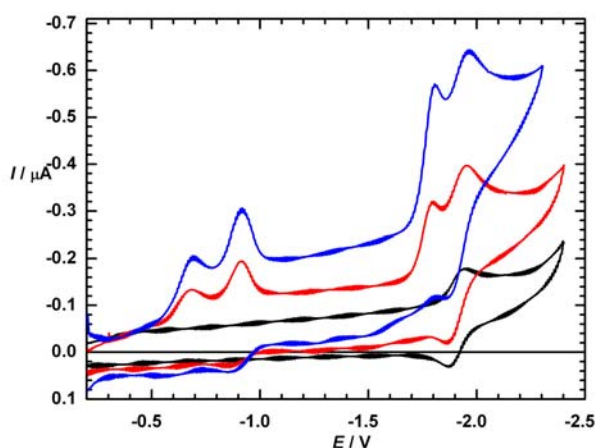
DC polarogram roztoku organometalického komplexu TB11 (0,22 mmol/l) v 0,1M roztoku TBAPF<sub>6</sub> v DMSO je na obrázku *Obr. 7.1* na str. 27. Měření probíhalo na SMDE s dobou kapky 1,5 s. Černá křivka představuje polarogram základního elektrolytu (0,1M roztok TBAPF<sub>6</sub> v DMSO). Při hodnotách potenciálu -1,9 V a negativnějších dochází k redukci draselných kationtů, které se v daném elektrolytu nacházejí jako nečistoty. Tento proud je konstantní při konstantní koncentraci TBAPF<sub>6</sub>. Polarografická křivka organometalického komplexu TB11 (červená křivka) vykazuje v rozsahu měřených potenciálů 4 polarografické vlny. U všech vln došlo ke zvýšení měřeného proudu při zvýšení koncentrace TB11 na  $c = 0,47$  mmol/l (modrá křivka). Se zvyšující se koncentrací se první dvě vlny spojily v jednu protáhlou vlnu. Nárůst čtvrté vlny jasně poukazuje na redukční proces, který probíhá paralelně s vylučováním draselných nečistot.



Obr. 7.1: DC polarografie nevodného roztoku TB11

TB11 ( $c = 0,22$  mmol/l, červená křivka,  $c = 0,47$  mmol/l, modrá křivka) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO. Pracovní elektroda SMDE, pomocná platinová síťka, referentní argentchloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl, doba kapky 1,5 s. Černá křivka odpovídá základnímu elektrolytu.

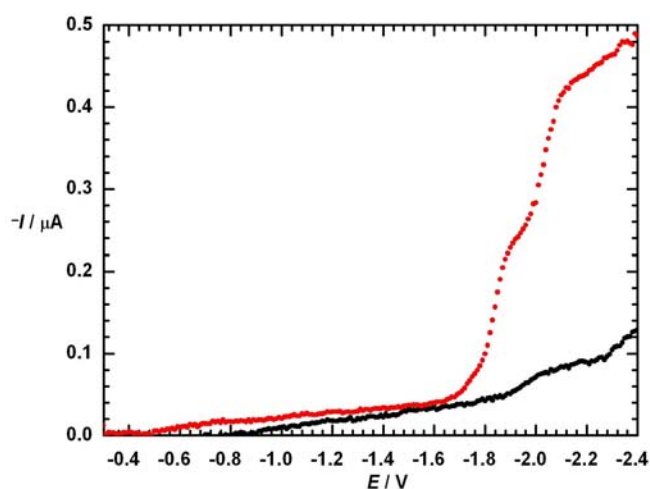
Roztoky TB11 v DMSO jsme změřili také metodou cyklické voltametrie při různých rychlostech polarizace (v rozmezí 0,05 – 8 V/s). Na Obr. 7.2 je ukázka voltametrických křivek základního elektrolytu (černá křivka), 0,22mM TB11 (červená křivka) a 0,47mM TB11 (modrá křivka) v 0,1M roztoku TBAPF<sub>6</sub> v DMSO měřených na HMDE při rychlosti polarizace 0,5 V/s. V daném rozsahu potenciálů TB11 poskytuje 4 redukční vlny. Stejně jako při DC polarografii vysoké hodnoty procházejícího proudu při -1,9 V ukazují na přítomnost draselných kationtů v roztoku základního elektrolytu.



Obr. 7.2: Cyklická voltametrie nevodného roztoku TB11

TB11 ( $c = 0,22$  mmol/l, červená křivka,  $c = 0,47$  mmol/l, modrá křivka) - 0,1M TBAPF<sub>6</sub> - DMSO. Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda - platinová síťka, referentní - argentchloridová elektroda Ag | AgCl | 1M LiCl. Rychlost polarizace 0,5 V/s. Černá křivka odpovídá základnímu elektrolytu.

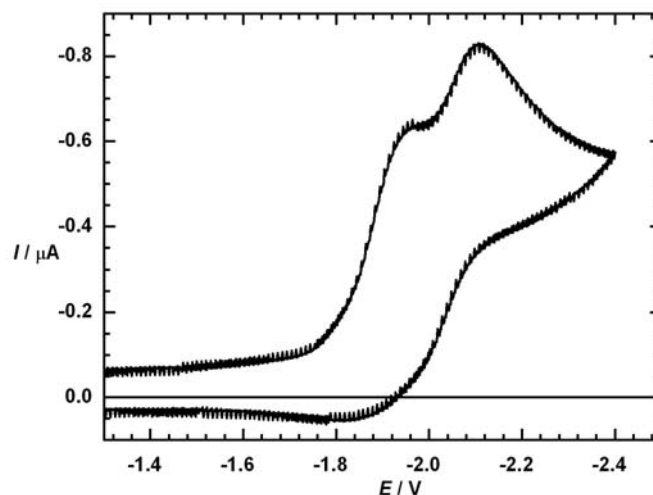
Pro lepší pochopení redukčního chování TB11 se přistoupilo ke studiu redukčních vlastností 1,10-fenantrolinu, protože je strukturální součástí TB11. Na obrázku *Obr. 7.3* je vynesena graf závislosti polarografického proudu na vkládaném napětí pro roztok 1,10-fenantrolinu o koncentraci 0,12 mmol/l v DMSO (červená křivka). Jako základní elektrolyt (černá křivka) jsme použili THAPF<sub>6</sub> o koncentraci 0,1 mol/l. Měření proběhlo na SMDE s dobou kapky 2 s. Roztok 1,10-fenantrolinu vykázal v daném potenciálovém rozsahu dvě redukční vlny. Půlvalnový potenciál první vlny je  $E_{1/2} = -1,80$  V a druhé  $E_{1/2} = -2,05$  V. Druhá vlna je u stejného potenciálu jako redukce draselných solí. Za stejných podmínek byl proměřen roztok 1,10-fenantrolinu o koncentraci 0,26 mmol/l. V tomto případě se přítomné vlny zvýšily, ale jinak se nezměnily (polarogram nezobrazen).



*Obr. 7.3:* DC polarografie nevodného roztoku 1,10-fenantrolinu

1,10-fenantrolin ( $c = 0,12$  mmol/l, červená křivka) - 0,1M THAPF<sub>6</sub> - DMSO. Pracovní elektroda SMDE, pomocná platinová síťka, referentní argentchloridová elektroda Ag|AgCl|1M LiCl, doba kapky 2 s. Černá křivka odpovídá základnímu elektrolytu.

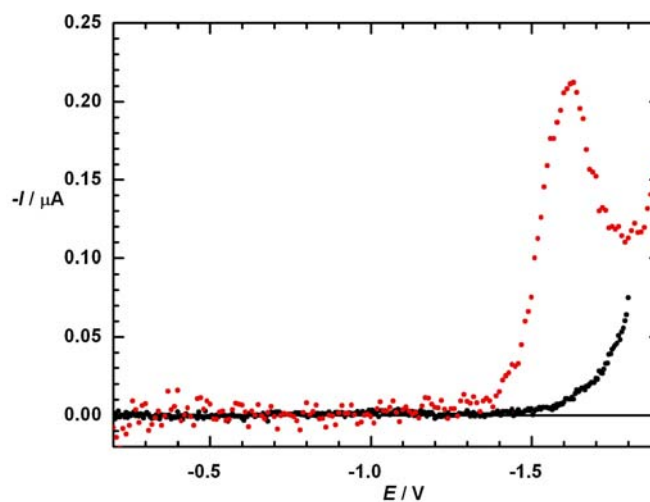
Pro stejný roztok 1,10-fenantrolinu jsme proměřili i cyklickou voltametrii. *Obr. 7.4* na str. 29 zobrazuje voltametrickou křivku pro 0,12 mM roztok 1,10-fenantrolinu v 0,1M THAPF<sub>6</sub> v DMSO. Toto měření proběhlo na HMDE při rychlosti polarizace 0,5 V/s, ale byly proměřeny křivky i při jiných rychlostech. Stejně jako u DC polarografie jsou i zde přítomny dvě vlny zobrazující redukci elektroaktivní látky v roztoku. Zvýšením koncentrace 1,10-fenantrolinu na 0,26 mmol/l došlo ke zvýšení přítomných vln, ale ne ke změně jejich tvaru.



Obr. 7.4: Cyklická voltametrie nevodného roztoku 1,10-fenanthrolinu

1,10-fenanthrolinu ( $c = 0,12 \text{ mmol/l}$ ) -  $0,1\text{M THAPF}_6$  - DMSO. Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda - platinová síťka, referentní - argentchloridová elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M LiCl}$ . Rychlost polarizace  $0,5 \text{ V/s}$ .

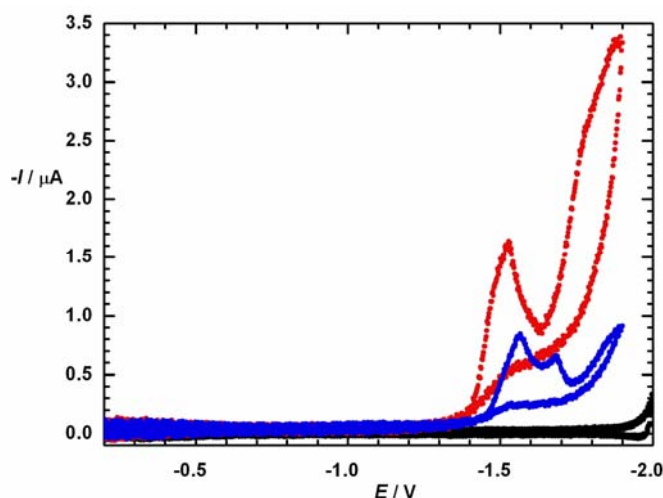
Elektrochemické chování komplexu TB11 jsme studovali i ve vodném prostředí. DC polarogram jeho  $0,018\text{mM}$  roztoku je zobrazen na obrázku Obr. 7.5. Měření probíhalo ve vodném roztoku za použití  $0,1\text{M KCl}$  jako základního elektrolytu na SMDE s nastavenou dobou kapky  $2 \text{ s}$ . V potenciálové oblasti  $-0,2$  až  $-1,9 \text{ V}$  roztok vykazuje jednu redukční vlnu, která je zřejmě ovlivněná tvorbou filmu na povrchu elektrody (snížení proudu se zvyšujícím se vkládaným napětím).



Obr. 7.5: DC polarografie vodného roztoku TB11

TB11 ( $c = 0,018 \text{ mmol/l}$ ) -  $0,1\text{M KCl}$  - deionizovaná voda. Pracovní elektroda SMDE, pomocná platinová síťka, referentní argentchloridová elektroda  $\text{Ag}|\text{AgCl}|1\text{M LiCl}$ , doba kapky  $2 \text{ s}$ .

Pro vodný roztok komplexu TB11 jsme změřili i cyklickou voltametrii. Na *Obr. 7.6* je vynesena cyklický voltamogram 1,75  $\mu\text{M}$  TB11 v 0,1M vodném roztoku KCl. Měření proběhlo na HMDE při rychlosti polarizace 0,0156 V/s (červená křivka) a 0,0625 V/s (modrá křivka). Na *Obr. 7.6* je patrné snížení redukčního signálu v oblasti potenciálů od -1,53 V do -1,77 V. Měření pro stejný roztok jsme provedli i za jiných rychlostí polarizace. Oproti očekávanému trendu zvyšování redukční vlny se zvyšující se rychlostí polarizace, se redukční proud snižoval. Proud tedy dosáhl nejvyšších hodnot v případě pomalé změny aplikovaného napětí.



*Obr. 7.6:* Cyklická voltametrie vodného roztoku TB11

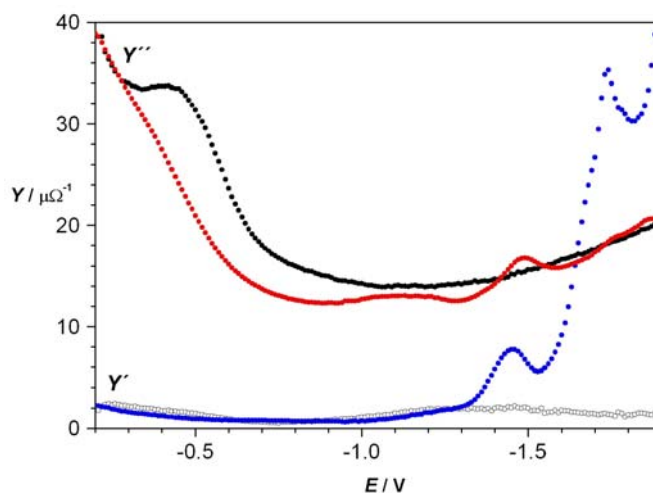
TB11 ( $c = 1,75 \mu\text{M}$ ) - 0,1M KCl - deionizovaná voda. Pracovní elektroda HMDE, pomocná elektroda - platinová síťka, referentní - argentchloridová elektroda  $\text{Ag} | \text{AgCl} | 1\text{M LiCl}$ . Rychlost polarizace 0,0156 V/s (červená křivka) a 0,0625 V/s (modrá křivka).

Významnou vlastností proteinů projevující se při zkoumání elektrochemického chování jejich roztoků je jejich schopnost adsorbovat se na povrch elektrody. Adsorpční vlastnosti papainu (a pro srovnání i ostatních měřených látek) jsme zkoumali za použití fázově rozlišené AC voltametrie na HMDE.

V níže uvedených AC voltamogramech bude vždy křivka zobrazující průběh imaginární složky admitance ( $Y''$ ) tvořena černými plnými kroužky pro základní elektrolyt a červenými pro roztok měřené látky. Reálná složka admitance ( $Y'$ ) je pak vynesena modrými kroužky pro roztok měřené látky a prázdnými černými kroužky pro roztok základního elektrolytu.

*Obr. 7.7* na str. 31 představuje AC voltametrické měření vodného roztoku komplexu TB11 o koncentraci 1,75  $\mu\text{mol/l}$  v základním elektrolytu 0,1M roztoku KCl.

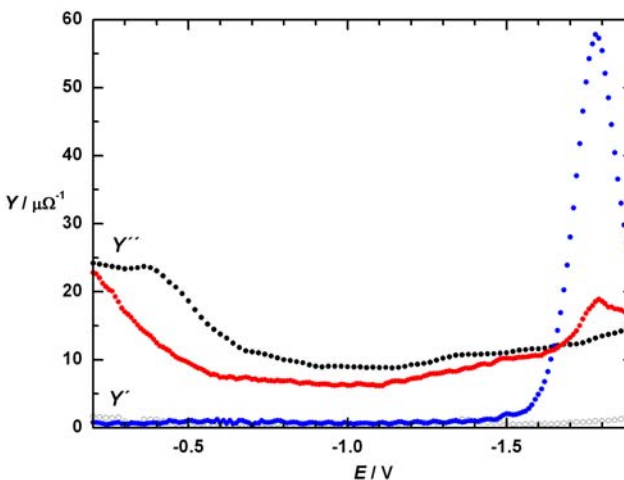
Měření proběhlo na HMDE při frekvenci 16 Hz. Naměřené hodnoty  $Y''$  v oblasti potenciálů od -0,2 V do -1,3 V klesají s přidavkem TB11. Kvazi-reverzibilní redox proces je pozorován při potenciálu -1,45 V, následován ireverzibilním procesem.



Obr. 7.7: AC voltammetrické měření vodného roztoku TB11

TB11 ( $c = 1,75 \mu\text{mol/l}$ , červená ( $Y''$ ) a modrá křivka ( $Y'$ )) - 0,1M KCl - deionizovaná voda. HMDE při frekvenci 16 Hz a rychlosti polarizace 10 mV za 4 s. Černé křivky platí pro základní elektrolyt.

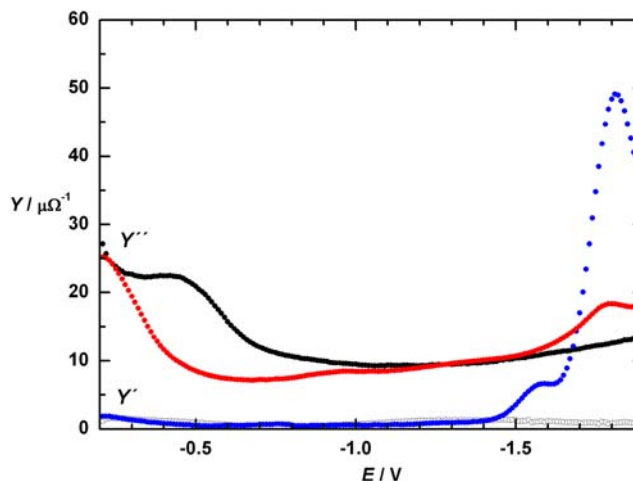
Obrázek Obr. 7.8 znázorňuje výsledné AC voltammetrické křivky pro 1  $\mu\text{M}$  roztok papainu v 0,1M KCl. Měření proběhlo na HMDE při frekvenci 16 Hz. Pokles naměřených hodnot  $Y''$  v potenciálové oblasti mezi -0,2 V a -1,5 V je následován výraznou vlnou s vrcholem při -1,78 V. Tato vlna značí jasný kvazi-reverzibilní proces.



Obr. 7.8: AC voltammetrické měření roztoku papainu

Papain (1  $\mu\text{mol/l}$ , červená ( $Y''$ ) a modrá křivka ( $Y'$ )) - 0,1M KCl - deionizovaná voda. HMDE při frekvenci 16 Hz a rychlosti polarizace 10 mV za 4 s. Černé křivky zobrazují reálnou a imaginární složku admitance pro základní elektrolyt.

AC voltametrie pro  $1\mu\text{M}$  roztok papainu s navázaným komplexem TB11 je uvedena na obrázku *Obr. 7.9*. Měření bylo provedeno na HMDE při frekvenci 16 Hz v  $0,1\text{M}$  roztoku KCl v deionizované vodě. Hodnoty imaginární složky admitance nejprve klesají, poté dochází k jejich pozvolnému nárůstu. Hodnoty reálné složky admitance  $Y'$  vykazují signál ireverzibilního děje s vrcholem při  $-1,58\text{ V}$  a výrazný signál u  $-1,81\text{ V}$  odpovídající kvazi-reverzibilnímu procesu.

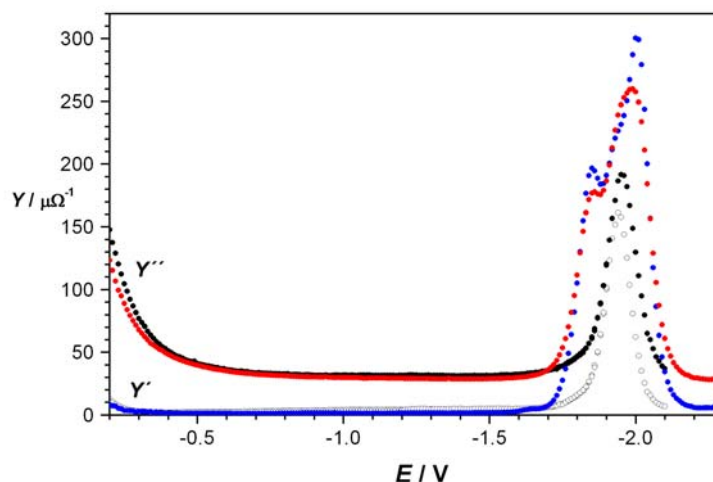


*Obr. 7.9:* AC voltametrie vodného roztoku papainu s navázaným komplexem TB11

Papain s navázaným komplexem TB11 ( $1\mu\text{mol/l}$ , červená ( $Y''$ ) a modrá křivka ( $Y'$ )) -  $0,1\text{M}$  KCl - deionizovaná voda, HMDE při frekvenci 16 Hz a rychlosti polarizace  $10\text{ mV}$  za  $4\text{ s}$ . Černé křivky zobrazují reálnou a imaginární složku admitance pro základní elektrolyt.

Pro lepší pochopení chování TB11 jsme studovali redukci 1,10-fenanthrolinu také pomocí AC voltametrie. Na obrázku *Obr. 7.10* na str. 33 je výsledný AC voltamogram roztoku 1,10-fenanthrolinu v  $0,1\text{M}$  roztoku  $\text{THAPF}_6$  v DMSO. Měření bylo provedeno na HMDE při frekvenci 16 Hz. Z AC voltamogramu je patrné, že na rozdíl od předchozích AC měření (*Obr. 7.7* až *Obr. 7.9*) imaginární složka admitance zpočátku kopíruje průběh křivky základního elektrolytu. Signál na obou křivkách pro základní elektrolyt při  $-1,95\text{ V}$  značí téměř reverzibilní redukci draselných kationtů přítomných v  $\text{THAPF}_6$ . Obě složky admitance roztoku 1,10-fenanthrolinu vykazují dva redukční signály při potenciálech  $-1,85\text{ V}$  a  $-1,99\text{ V}$ .





Obr. 7.10: AC voltametrie roztoku 1,10-fenanthrolinu

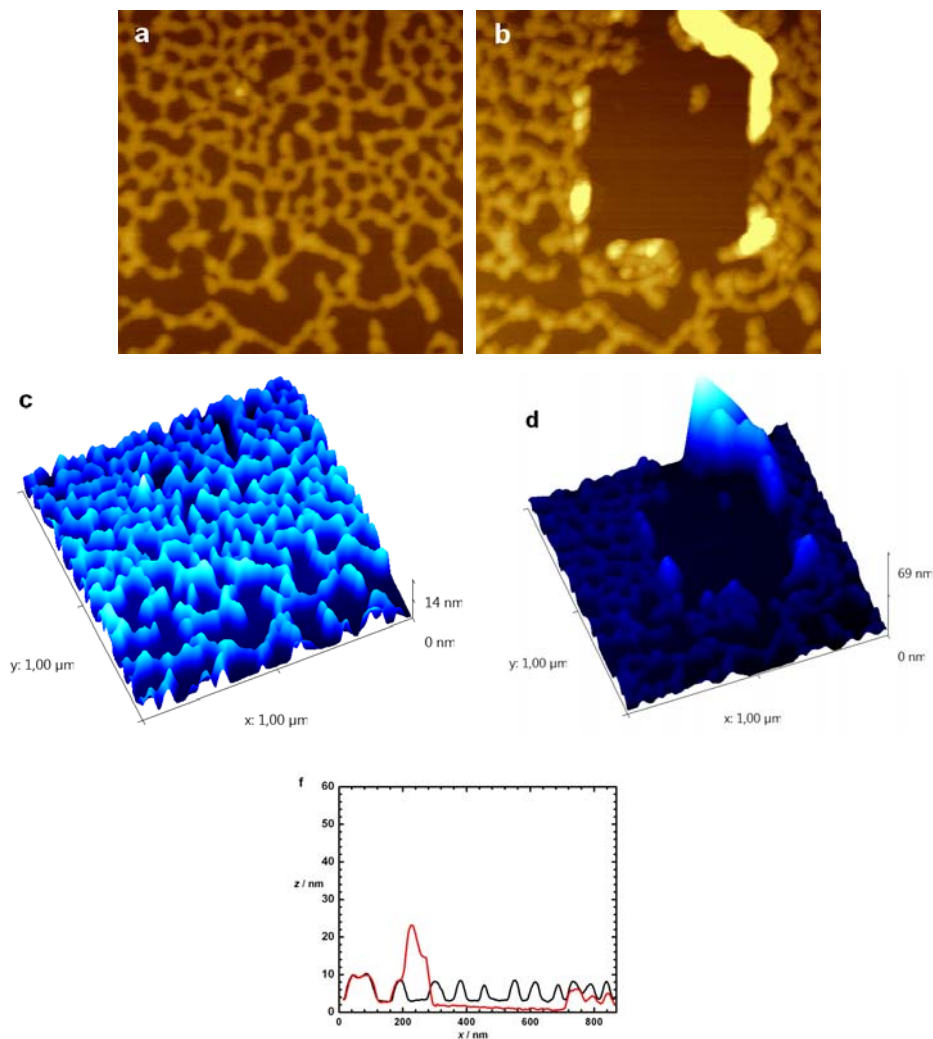
1,10-fenanthrolin ( $5 \times 10^{-4}$  mol/l, červená ( $Y''$ ) a modrá křivka ( $Y'$ )) - 0,1M THAPF<sub>6</sub> – DMSO, HMDE při frekvenci 16 Hz a rychlosti polarizace 10 mV za 4 s. Černé křivky zobrazují reálnou a imaginární složku admitance pro základní elektrolyt.

## 7.2. Mikroskopie atomárních sil

Elektrochemická měření prokázala silnou adsorpci papainu na povrch elektrody. Z tohoto důvodu jsme metodou AFM zkoumali vlastnosti naadsorbované vrstvy proteinu na různě povrchově modifikovaných substrátech. Z literatury<sup>30,31</sup> je známo, že adsorpční vlastnosti proteinů závisí na vlastnostech substrátu (hydrofilicita, hydrofobicita, hustota náboje, atd.) a ke studiu adsorpčních vlastností byly proto použity tři látky, jmenovitě dodekan-1-thiol, 11-sulfanylundekan-1-ol a kyselina 11-sulfanylundekan-1-ová. Všechny uvedené triolové látky tvoří monovrstvy na povrchu zlata pomocí S-Au kovalentních vazeb. Molekuly papainu tedy mohly interagovat pouze s funkčními skupinami na opačné straně molekuly oproti thiolové skupině. U 11-sulfanylundekan-1-olu se tedy jedná o hydroxylovou skupinu ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), u dodekan-1-thiolu o methylovou skupinu ( $-\text{CH}_3$ ) a u 11-sulfanylundekan-1-ové kyseliny o karboxylovou skupinu ( $-\text{COOH}$ ). Jako nemodifikovaný povrch byl použit HOPG.

Adsorpce papainu na povrchu HOPG byla studována pomocí ACAFM. Reprezentativní obrázek vybraný z několika zobrazení různých oblastí na substrátu je zobrazen na Obr. 7.11 na str. 34. Na žádné z naměřených oblastí papain nepokryval

celý povrch zobrazené části substrátu. Svrchní vrstva vzorku byla snadno odškrabatelná. Kolem očištěné oblasti jsou jasně zřetelné bariéry shrnutého proteinu.

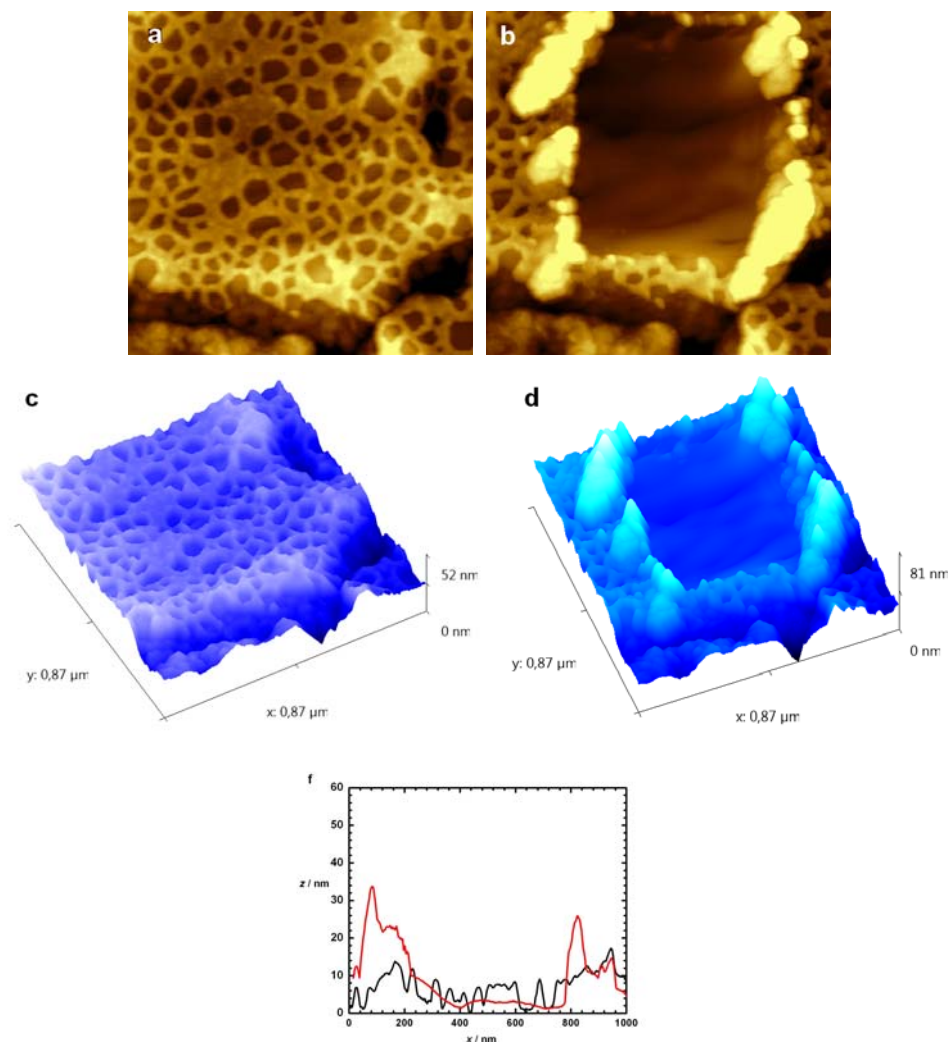


*Obr. 7.11:* AFM měření vzorku papainu na HOPG

Obrázky **a** a **c**: původní vrstva papainu metodou ACAFM. Obrázky **b** a **d** vznikly odstraněním části svrchní vrstvy kontaktním režimem. Celá oblast byla následně zobrazena metodou ACAFM. Rozměry zobrazené plochy na obrázcích **a** a **b** jsou  $950 \times 950 \text{ nm}^2$ . Graf na obrázku **f** znázorňuje rozdíly v řezu v případě neporušené vrstvy (černá křivka) a při částečném odškrabání (červená křivka). Všechny obrázky byly změřeny v původním rozměru oblasti  $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$  rychlostí  $1,0 \text{ }\mu\text{m/s}$  a s rezonanční frekvencí hrotu  $60,0 \text{ kHz}$ .

Na obrázku *Obr. 7.12* na str. 35 je jedno ze zobrazení povrchu zlaté destičky pokryté vrstvou dodekan-1-thiolu a následně naadsorbovanou vrstvou papainu. Papain na tomto substrátu vždy vytvořil nejednotlivou vrstvu, která šla snadno odstranit. Odškrábané molekuly vytvořily po okrajích očištěné plochy jasně patrné bariéry. Při porovnání s výše uvedeným zobrazením papainu na čistém HOPG (*Obr. 7.11*) je

patrné, že se v tomto případě naadsorbovalo větší množství proteinu, které ale nestačilo na vytvoření nepřerušené vrstvy. Dále je jasně patrné, že pokrytí papainem není rovnoměrné, místy došlo k jeho akumulaci oproti jiným oblastem.

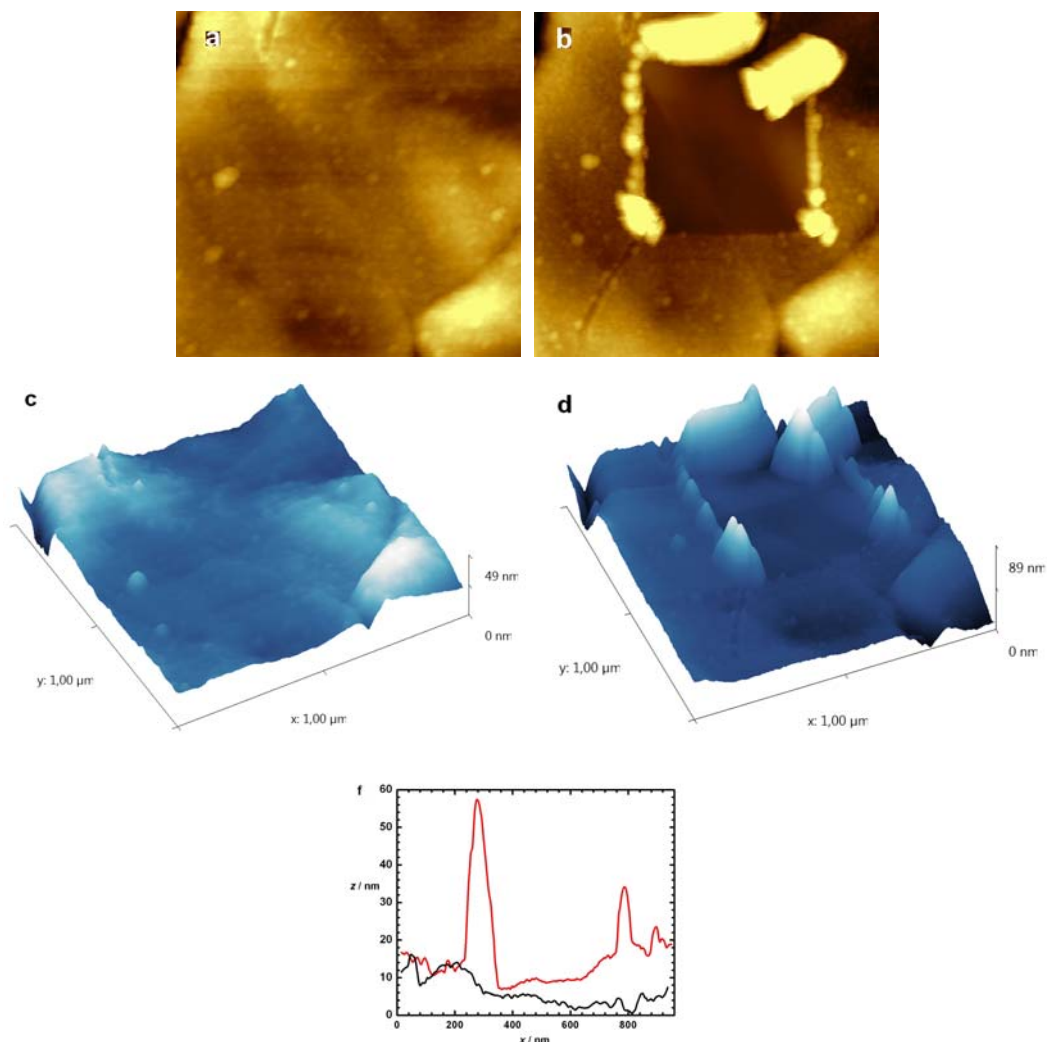


*Obr. 7.12:* AFM zobrazení papainu na povrchu zlaté destičky pokryté dodekan-1-thiolem

Obrázky **a** a **c** znázorňují vrstvu papainu zobrazenou metodou ACAFM. Obrázky **b** a **d** vznikly odstraněním části svrchní vrstvy kontaktním režimem. Celá oblast byla následně zobrazena metodou ACAFM. Rozměry zobrazené plochy na obrázcích **a** a **b** jsou  $870 \times 870 \text{ nm}^2$ . Graf na obrázku **f** znázorňuje rozdíly v řezu v případě neporušené vrstvy (černá křivka) a při částečném odškrábání (červená křivka). Oblast o původních rozměrech  $870 \times 870 \text{ nm}^2$  byla v případě obrázků **a** a **c** zobrazena rychlostí  $0,9 \text{ } \mu\text{m/s}$  a v případě obrázků **b** a **d**  $0,4 \text{ } \mu\text{m/s}$ . Frekvence oscilací hrotu byla  $144,1 \text{ kHz}$ .

Obrázek *Obr. 7.13* na str. 36 zobrazuje povrch zlaté destičky pokryté vrstvou kyseliny 11-sulfanylundekan-1-ové a následně papainem. Papain se na všechny zobrazené části substrátu adsorboval v jedolité vrstvě o podobné tloušťce. Pouze

místy molekuly utvořily vyšší útvary. Papain bylo snadné odškrabat. Vysoké bariéry vzniklé odškrábáním svrchní části naadsorbované vrstvy se částečně sesunuly zpět na původně očištěnou plochu.

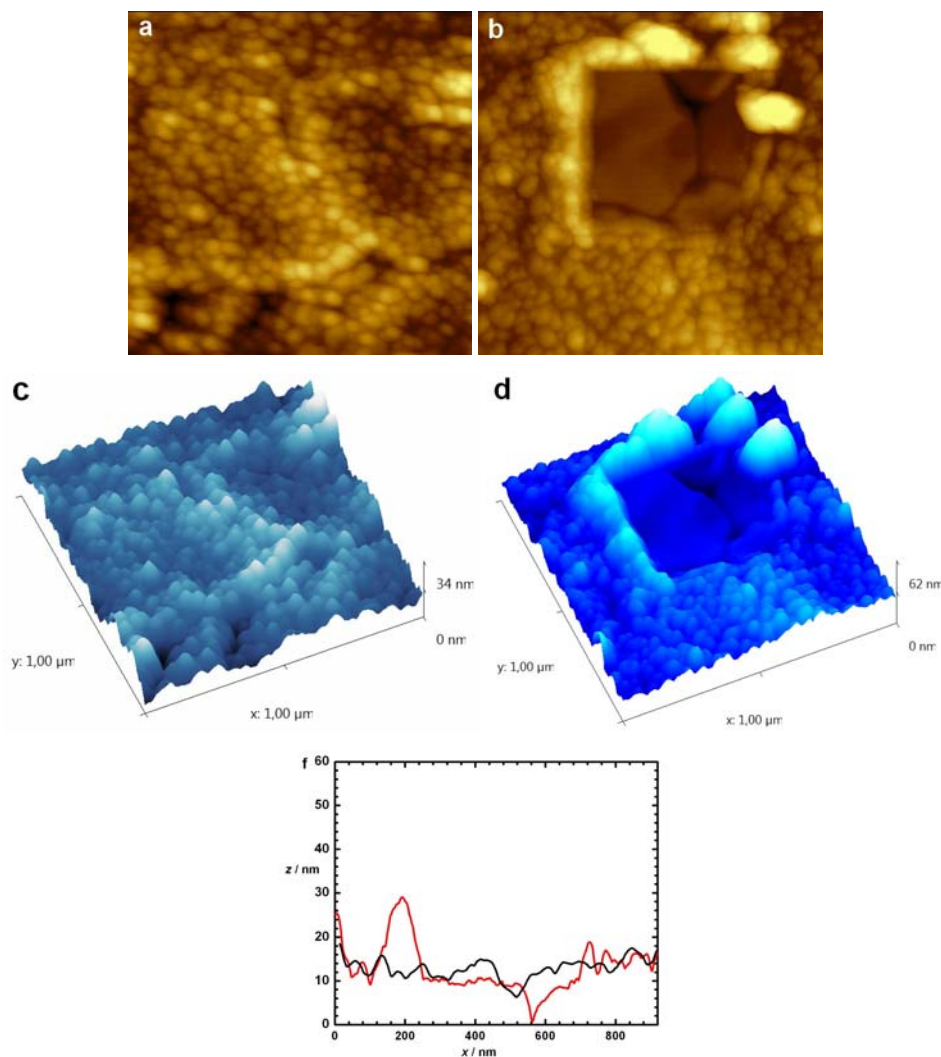


*Obr. 7.13:* AFM zobrazení vrstvy papainu na zlaté destičce pokryté 11-sulfanylundekan-1-ovou kyselinou

Obrázky **a** a **c** znázorňují vrstvu papainu zobrazenou metodou ACAFM. Obrázky **b** a **d** vznikly odstraněním části svrchní vrstvy kontaktním režimem. Celá oblast byla následně zobrazena metodou ACAFM. Rozměry zobrazené plochy na obrázcích **a** a **b** jsou  $950 \times 950 \text{ nm}^2$ . Graf na obrázku **f** znázorňuje rozdíly v řezu v případě neporušené vrstvy (černá křivka) a při částečném odškrábání (červená křivka). Oblast v původním rozměru  $1 \times 1 \text{ μm}^2$  byla změřena rychlostí  $1,0 \text{ μm/s}$  pro obrázky **a** a **c** a rychlostí  $0,9 \text{ μm/s}$  pro obrázky **b** a **d**. Hrot osciloval s frekvencí  $60,0 \text{ kHz}$ .

Silnou nepravidelně vysokou vrstvou utvořily molekuly papainu na povrchu zlaté destičky pokryté 11-sulfanylundekan-1-olem (*Obr. 7.14*, str. 37). Neporušenou vrstvu proteinu jsme pozorovali na všech studovaných částech destičky. Při porovnání

s předchozím vyobrazením papainu adsorbovaném na destičce modifikované kyselinou sulfanylundekan-1-ovou (*Obr. 7.13* na str. 36) je jasně patrné, že i v tomto případě došlo k úplnému pokrytí povrchu, nicméně adsorbovaná vrstva má zcela jiný charakter. Molekuly se adsorbovaly v několika vrstvách. Odškrábáním bylo možné odstranit veškerý naadsorbovaný papain ve vybrané oblasti, je zde dokonce patrná charakteristická struktura povrchu monokrystalického zlata.



*Obr. 7.14:* AFM zobrazení papainu adsorbovaného na zlaté destičce pokryté 11-sulfanylundekan-1-olem

Obrázky **a** a **c** znázorňují vrstvu papainu zobrazenou metodou ACAFM. Obrázky **b** a **d** vznikly odstraněním části svrchní vrstvy kontaktním režimem. Celá oblast byla následně zobrazena metodou ACAFM. Rozměry zobrazené plochy na obrázcích **a** a **b** jsou  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ . Graf na obrázku **f** znázorňuje rozdíly v řezu v případě neporušené vrstvy (černá křivka) a při částečném odškrábání (červená křivka). Oblast o rozměrech  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  byla v případě obrázků **a** a **c** zobrazena rychlostí  $0,5 \mu\text{m/s}$  a v případě obrázků **b** a **d**  $0,7 \mu\text{m/s}$ . Frekvence oscilací hrotu byla  $54,8 \text{ kHz}$ .

## 8. Diskuse

### 8.1. Elektrochemická měření

Obecně je pro elektrochemická měření vhodnější použití nevodného prostředí, protože v organickém rozpouštědle je potlačena adsorpce látek přítomných v roztoku na povrch elektrody. Použití acetonitrilu se pro měření elektrochemického chování organometalického komplexu neosvědčilo. Výsledky nebyly reprodukovatelné a to zřejmě v důsledku nestability TB11 v daném rozpouštědle. Studium elektrochemického chování TB11 v prostředí DMSO bylo sice komplikováno redukcí draselných kationtů přítomných v THAPF<sub>6</sub> a TBAPF<sub>6</sub> základních elektrolytech, ale obecně neznemožňovalo elektrochemická měření.

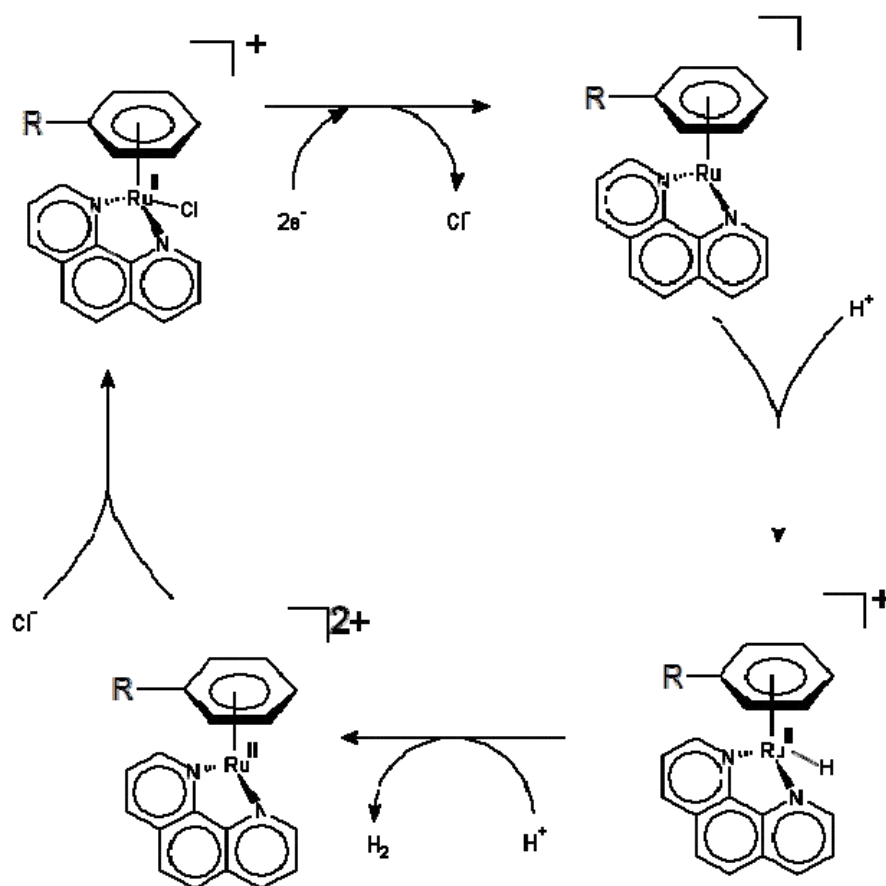
Vzhledem k nebezpečí denaturace proteinu v organickém prostředí jsme roztoky papainu měřili ve vodném roztoku KCl. Pro porovnání chování komplexu TB11 kovalentně vázaném na papain a ve volné formě jsme provedli i měření elektrochemického chování volného TB11 komplexu ve vodném roztoku KCl.

Při porovnání výsledků měření elektrochemického chování TB11 v nevodném prostředí (např. DC polarogram na *Obr. 7.1*, str. 27) s odpovídajícími grafy pro roztok 1,10-fenantrolinu (DC polarogram na *Obr. 7.3*, str. 28) je patrné, že signály při potenciálech -1,70 V a -1,89 V v grafech pro roztok TB11 odpovídají dvěma vlnám postupné redukce 1,10-fenanthrolinu. Posun hodnot půlvlnových potenciálů k pozitivnějším hodnotám je výsledkem komplexace 1,10-fenanthrolinu a pravděpodobně důsledkem částečného přesunu elektronové hustoty od molekuly 1,10-fenanthrolinu směrem ke kovu v komplexu. První dvě vlny na *Obr. 7.1*, str. 27 a *Obr. 7.2*, str. 27 nemají na grafech pro roztok 1,10-fenanthrolinu odpovídající signály a jsou způsobeny elektrochemickou reakcí jiné než fenanthrolinové části komplexu TB11, což by odpovídalo redukci dvojmocného ruthenia.

Elektrochemická redukce TB11 ve vodném prostředí přináší ještě zajímavější výsledky. Vlna u -0,6 V se nepozoruje, ale je pozorována až při -1,5 V. Vzhledem ke zvyšujícím se hodnotám redukčního proudu se snižující se rychlostí polarizace pozorovaným na *Obr. 7.6*, str. 30, je možné nárůst proudu připsat katalytickému procesu, spojenému s vylučováním vodíku.<sup>32</sup> Návrh probíhajícího katalytického cyklu je uveden na *Obr. 8.1* na str. 39. Předpokládáme, že molekula TB11, přítomná



u povrchu pracovní elektrody, je následkem elektrodové reakce redukována za přijetí pravděpodobně dvou elektronů. Počet elektronů zatím nebyl potvrzen a je předmětem dalšího zkoumání. Současně s přenosem elektronu na dvojmocné ruthenium dochází k uvolnění chloridového aniontu. Takto vzniklý intermediát může přijmout proton z vodného roztoku za tvorby elektronově bohatého hydridového iontu navázaného na atom dvojmocného ruthenia. Komplex obsahující hydridový aniont interaguje s dalším volným protonem z roztoku za uvolnění molekuly vodíku. Na prázdné místo poté může opět přistoupit chloridový aniont, přičemž je komplex TB11 regenerován a může podstoupit další cyklus vylučování vodíku vyjádřeného sumárně jako  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ . Inspirací pro návrh schématu cyklu byla práce Kaima a kol.<sup>32</sup> Pro potvrzení navrhovaného katalytického cyklu je nutné provést mnohá další měření. Počet přijatých elektronů by mohl být zjištěn úplnou elektrolýzou TB11 v nevodném prostředí. Výsledky by mohlo přinést i elektrochemické zkoumání komplexu TB11 v DMSO za přidavku vody nebo studium chování komplexu v jiném rozpouštědle.



Obr. 8.1: Schéma katalytického cyklu TB11

Nejdůležitější výsledky představují fázově rozlišená AC měření. AC voltamogramy pro všechny měřené vodné roztoky vykazují pokles imaginární složky admitance pro roztoky s přidavkem analytů oproti křivkám pro základní elektrolyt. Tato skutečnost signalizuje přítomnost adsorpce elektroaktivní látky na povrchu HMDE a byla podnětem pro podrobnější zkoumání adsorpčních vlastností papainu na modifikovaných substrátech.

První vlna na AC voltametrické křivce vodného roztoku TB11 (*Obr. 7.7*, str. 31) je pravděpodobně způsobena probíhajícím katalytickým cyklem (*Obr. 8.1*, str. 39). Druhá pak značí elektrochemickou přeměnu 1,10-fenantrolinu, která ukončí probíhající katalytické vylučování vodíku. Pravděpodobně je jí odpovídající vlna zřetelná na AC voltamogramu roztoku 1,10-fenantrolinu při potenciálu -1,85 V (*Obr. 7.10*, str. 33).

Průběh AC voltametrické křivky roztoku papainu (*Obr. 7.8*, str. 31) ukazuje na adsorpci proteinu na povrch elektrody a následně pravděpodobně na katalytické vylučování vodíku, jak ho popsal Brabec.<sup>23</sup>

Vlna signalizující probíhající katalytický cyklus (*Obr. 8.1*, str. 39) je přítomná na AC voltametrické křivce pro roztok papainu s navázaným komplexem TB11 s vrcholem při potenciálu -1,58 V. Je však patrné, že je méně výrazná než odpovídající vlna na AC voltamogramu roztoku TB11 při potenciálu -1,45 V (*Obr. 7.7*, str. 31). Posun i snížení signálu je zřejmě způsobeno částečným zastíněním komplexu TB11 aktivním centrem enzymu. Při potenciálu -1,81 V dochází k vylučování vodíku katalyzovaném papainem stejně jako tomu bylo u roztoku čistého papainu (*Obr. 7.8*, str. 31).

Probíhající vylučování vodíku v přítomnosti komplexu TB11, ať už ve volné formě nebo po navázání do aktivního centra papainu, potřebuje nízkou rychlost polarizace. Dostatečný čas katalýze poskytuje AC voltametrie a cyklická voltametrie při nastavené pomalé rychlosti polarizace.

## **8.2. Mikroskopie atomárních sil**

Z grafů uvedených pro jednotlivá měření je patrné, že papain adsorbovaný na čistý povrch HOPG (*Obr. 7.11*, str. 34) a na povrch zlata s vrstvou dodekan-1-thiolu



(Obr. 7.12, str. 35), tvoří na povrchu substrátů nejednotitou monovrstvu. V obou případech (zejména pak na zobrazeních pro dodekan-1-thiol) je patrná tvorba center, kde se k jedné naadsorbované molekule připojovaly další. Na zlatou destičku pokrytou vrstvou 11-sulfanylundekan-1-ové kyseliny (Obr. 7.13, str. 36) se papain adsorboval v jedné monovrstvě, naopak na povrch pokrytý 11-sulfanylundekan-1-olem (Obr. 7.14, str. 37) se adsorboval v několika vrstvách.

Podle výpočtů má nejednotitá monomolekulární vrstva papainu adsorbovaná na povrch HOPG (Obr. 7.11, str. 34) tloušťku  $6,22 \pm 0,75$  nm. Pokrytí povrchu je v tomto případě asi 51 %. Jen o málo vyšší procento pokrytí (přibližně 59 %) jsme stanovili pro zlatou destičku pokrytou dodekan-1-thiolem (Obr. 7.12, str. 35). Na tomto povrchu se papain adsorboval za tvorby vrstvy o tloušťce  $6,17 \pm 0,89$  nm. Monovrstva papainu o tloušťce  $6,16 \pm 0,80$  nm se utvořila na povrchu zlaté destičky pokryté kyselinou 11-sulfanylundekan-1-ovou (Obr. 7.13, str. 36). Na zlatou destičku pokrytou 11-sulfanylundekan-1-olem (Obr. 7.14, str. 37) se papain naopak adsorboval v několika vrstvách. Tloušťku polyvrstvy jsme nestanovovali. Souhrn získaných dat je uveden v tabulce TAB. 9.1.

TAB. 8.1: Vlastnosti vrstvy papainu naadsorbovaného na jednotlivých substrátech

Substrát	HOPG	Au/-CH <sub>3</sub>	Au/-COOH	Au/-CH <sub>2</sub> OH
tloušťka vrstvy (nm)	$6,22 \pm 0,75$	$6,17 \pm 0,89$	$6,16 \pm 0,80$	neurčena
charakter vrstvy	submonovrstva	submonovrstva	monovrstva	multivrstva
pokrytí povrchu (%)	51	59	100	100

Podle výpočtů je výška monovrstev přibližně 6,2 nm, přičemž podle krystalografických měření provedených Drenthem je velikost molekuly papainu přibližně 5,6 nm.<sup>33</sup> Vzhledem k použití rozdílných metod o různém dosažitelném stupni přesnosti předpokládáme, že konformace papainu se adsorpcí výrazně nemění. Potvrzují to i naše závěry z AC voltametrických měření, kde se projevilo, že komplex TB11 umístěný v aktivním centru papainu adsorbovaném na povrch elektrody je stále dostupný a proto může v systému probíhat katalýza.

## 9. Souhrn

Prokázali jsme, že komplex TB11 je detekovatelný metodou AC voltametrie i pokud je navázaný na papain. Tento výsledek představuje experimentální nástroj pro porovnání katalytického chování enzymu modifikovaného sérií organometalických komplexů odvozených od TB11.

Na základě dat získaných elektrochemickými měřeními jsme provedli studii adsorpce papainu na různě modifikované povrchy. Klasickou monomolekulární vrstvu utvořil papain na povrchu substrátu pokrytého kyselinou 11-sulfanylundekan-1-ovou. Na methylovaný povrch (zlatá destička modifikovaná dodekan-1-thiolem) se papain adsorboval v nejdolité monomolekulární vrstvě. K nejvýraznější adsorpci papainu došlo na substrátu pokrytém 11-sulfanylundekan-1-olem. V tomto případě se adsorboval v několika vrstvách.

## 10. Seznam použité literatury

- <sup>1</sup> Otto H.-H., Schirmeister T.: Chem. Rev. 97 (1997) 133-171
- <sup>2</sup> Mitchel R. E. J., Chaiken I. M., Smith E. L.: J. Biol. Chem. 245, 14 (1970) 3485-3492
- <sup>3</sup> Haquette P., Talbi B., Canaguier S., Dagorne S., Fosse C., Martel A., Jaouen G., Salmain M.: Tetrahedron Lett. 49 (2008) 4670-4673
- <sup>4</sup> Nitsawang S., Hatti-Kaul, R., Kanasawud P.: Enzyme Microb. Technol. 39 (2006) 1103-1107
- <sup>5</sup> Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K.: Plant J. 37 (2004) 370-378
- <sup>6</sup> Pickersgill R.W.: Plant Enzymes for the Food Industry, v knize Plant Protein Engineering (Shewry P. R., Gutteridge S. ed.) Cambridge University Press, Cambridge 1992, str. 236
- <sup>7</sup> Lu Y.: Inorg. Chem. 45 (2006) 9930 citováno dle Steinreiber J., Ward T. R.: Coord. Chem. Rev. 252 (2008) 751-766
- <sup>8</sup> Kazlauskas R. J.: Curr. Opin. Biol. 9 (2005) 195-201
- <sup>9</sup> Steinreiber J., Ward T. R.: Coord. Chem. Rev. 252 (2008) 751-766
- <sup>10</sup> Haquette P., Salmain M., Svedlung K., Martel A., Rudolf B., Zakrzewski J., Cordier S., Roisnel T., Fosse C., Jaouen G.: ChemBioChem 8 (2007) 224-231
- <sup>11</sup> Canivet J., Süß-Fink G., Štěpnička P.: European Journal of Inorganic Chemistry, Issue 30 (2007) 4736-4742
- <sup>12</sup> Salmain M., Jaouen G.: C. R. Chim. 6 (2003) 249-258
- <sup>13</sup> Reetz M. T., Rentzsch M., Pletsch A., Maywald M., Maiwald P., Peyralans J. J.-P., Maichele A., Fu Y., Jiao N., Hollmann F., Mondière R., Taglieber A.: Tetrahedron 63 (2007) 6404-6414
- <sup>14</sup> Panella L., Broos J., Faaije M. W., Janssen D. B., Jeronimus-Stratingh M., Feringa B. L., Minnaard A. J., de Vries J. G.: Chem. Commun., Issue 45 (2005) 5656-5658
- <sup>15</sup> Kostic N. M.: Comment. Inorg. Chem. 8 (1988) 1199 cit. dle Salmain M., Jaouen G.: C. R. Chim. 6 (2003) 249-258
- <sup>16</sup> Kolektiv: Elektroanalytická chemie, skriptum PČF UK Praha (2005), a) str. 73-85; b) str. 106-109

- <sup>17</sup> Kolektiv: Analytická chemie III – Elektroanalytické metody, skriptum VŠCHT Pardubice, 1984, str. 37-46
- <sup>18</sup> Zusková I.: Materiály k předmětu Fyzikální chemie II (b) pro Přírodovědeckou fakultu UK v Praze, akademický rok 2008/2009
- <sup>19</sup> Zusková I. a kolektiv: Praktikum z fyzikální chemie, skriptum pro PřF UK Praha, elektronická verze z roku 2009, str. 19-21, staženo z <http://web.natur.cuni.cz/~zuskova/> 8. 4. 2010
- <sup>20</sup> Heyrovský J., Kůta J.: Základy polarografie, Nakladatelství Československé akademie věd Praha 1962, str. 24-39
- <sup>21</sup> <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/Chemistry/Electrochemis/Electrochemical/CyclicVoltammetry/CyclicVoltammetry.htm> staženo 26. 4. 2010
- <sup>22</sup> Pospíšil L.: Electrochemical Impedance and Related Techniques v knize Experimental Techniques in Bioelectrochemistry, Volume 3 (Brabec V., Walz D., Milazzo G., ed.) Birkhäuser Verlag, Basel 1996
- <sup>23</sup> Brabec V., Vetterl V., Vrána O.: Electroanalysis of Biomacromolecules, v knize Experimental Techniques in Bioelectrochemistry, Volume 3 (Brabec V., Walz D., Milazzo G., ed.) Birkhäuser Verlag, Basel 1996
- <sup>24</sup> Ošřádal I., Sobotík P.: Rastrovací tunelová mikroskopie (STM) a příbuzné techniky, v knize Metody analýzy povrchů – iontové, sondové a speciální metody (Frank L., Král J. ed.) Academia, nakladatelství AV ČR, Praha (2002), str. 275-295
- <sup>25</sup> Adamson A. W., Gast A. P.: Surfaces of Solids: Microscopy and Spectroscopy, v knize Physical Chemistry of Surfaces, John Wiley & Sons, New York (1997), str. 294-299
- <sup>26</sup> Gerd K. Binnig: Atomic Force Microscope and Method for Imaging Surfaces with Atomic Resolution, U.S. Pat. 4724318, 1988
- <sup>27</sup> Kada G., Kienberger F., Hinterdorfer P.: Nano Today 3 (2008) 12-19
- <sup>28</sup> <http://www.ntmdt.com/spm-principles>, staženo 15. 4. 2010
- <sup>29</sup> [http://www.nisenet.org/publicbeta/articles/seeing\\_atoms/index.html](http://www.nisenet.org/publicbeta/articles/seeing_atoms/index.html), staženo 15. 4. 2010
- <sup>30</sup> Sheller N. B., Petrash S., Foster M. D., Tsukruk V. V.: Langmuir 14 (1998) 4535-4544
- <sup>31</sup> Rixman M. A., Dean D., Macias C. E., Ortiz C.: Langmuir 19 (2003) 6202-6218
- <sup>32</sup> Kaim W., Reinhardt R., Greulich S., Sieger M., Klein A., Fiedler J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66 (2001) 291-306

- <sup>33</sup> Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Wolthers B. G.: The Structure of Papain, v knize  
Advances in Protein Chemistry, Volume 25 (Anfinsen C. B. ed.) Academic Press, New  
York 1971

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]